Zur Kenntnis der Anthrachinonderivate der Krappwurzel

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Eberhard-Karls-Universität

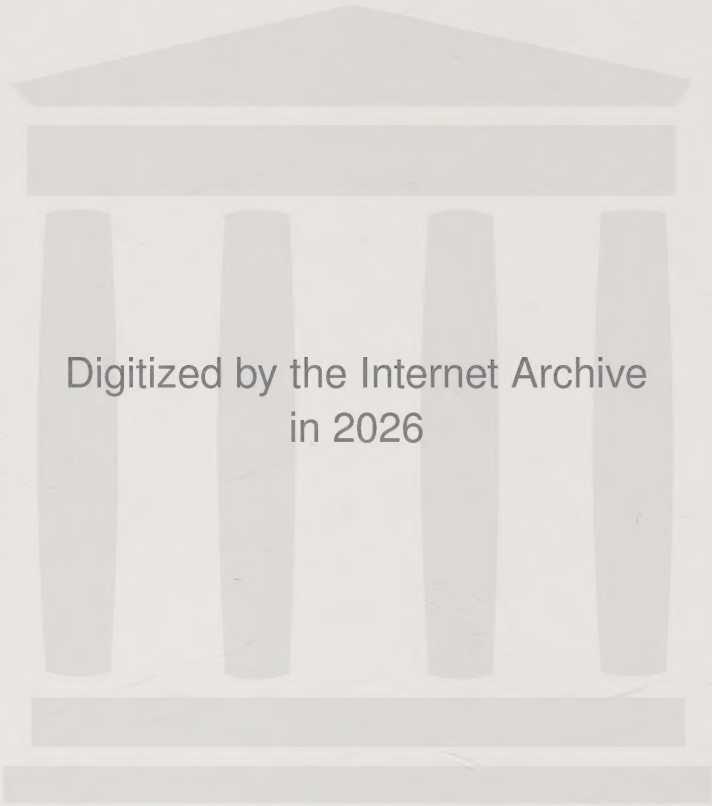
zu Tübingen

vorgelegt von

Friedrich Schröppel

aus Tübingen

1969


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547603_0097

Zur Kenntnis der Anthrachinonderivate der Krappwurzel

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Friedrich Schröppel

aus Tübingen

1969

Dekan: Professor Dr. A. Seilacher
1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Auterhoff
2. Berichterstatter: Professor Dr. E. Graf

Tag der mündlichen Prüfung: 22.4.1969

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG · Tübingen

Meiner Frau in Liebe

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Herrn Professor Dr. H. Auterhoff, meinem hochverehrten Lehrer, danke ich sehr herzlich für sein stetes Interesse an meiner Arbeit und die mir jederzeit erwiesene wohlwollende Förderung.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

Einleitung 1

I. Beschriebene Bestandteile der Droge 2
a) Freie Anthrachinone 2
b) Anthrachinone in glykosidischer Bindung 5
c) Anthrachinonfreie Inhaltsstoffe 8

II. Versuche zur Bornträger-Reaktion 10
a) Stabilität der Rotfärbung 11
b) Farbbildung mit Natronlauge oder Ammoniak 18
c) Farbbildung beim Alkalisieren mit Natriummethylat ... 22
d) Vergleich der Bornträger-Reaktion unter verschiedenen Bedingungen 28

III. Gehaltsbestimmung der Droge 29
a) Methodik 29
b) Gehalt der Droge 36

IV. Zuordnung der Glykoside zu den Aglukonen 39

V. Weitere Auftrennung der Anthrachinonfraktion 44
a) Trennung auf Calciumcarbonat- und Hyflo-Supercellsäulen 44
b) Trennung auf Polyamidsäulen 46
c) Trennung auf Sephadexsäulen 46
d) Vortrennung durch fraktioniertes Ausziehen der Droge 47
e) Isolierte Anthrachinonaglukone 48

Seite

VI. Darstellung der Glykoside 52

Zusammenfassung 53

Experimenteller Teil 55

Literaturverzeichnis 75

EINLEITUNG

Der "Krapp" (Rubia tinctorum) ist eine alte Kulturpflanze, die ihre hohe Bedeutung als Farbstofflieferant bis Ende des 19. Jahrhunderts gehalten hat. Die Pflanze ist vor allem in den Mittelmeerländern heimisch und kommt in diesen Gebieten auch heute noch wild in großen Beständen vor. Plinius und Dioscurides[+] berichteten über große Krappkulturen in der Umgebung von Rom und wiesen auf Qualitätsunterschiede beim Anbau hin. Im Reiche Karls des Großen machten sich besonders die Benediktiner um den Krappanbau verdient. Die Verwendung des Krapps trat mit der Renaissance mehr in den Vordergrund; sie entwickelte sich zu einer Industrie, welche in den Niederlanden, in Frankreich - im Rhonetal und im Elsaß - und in Deutschland - in der Pfalz und in Franken - heimisch wurde. Die Revolutionskriege unterbrachen diese Entwicklung. So sollen die roten Hosen der französischen Soldaten als Konjunkturankurbelung eingeführt worden sein[1].

Botanisch gehört die Pflanze in die Familie der Rubiaceen zur Gattung Galieae. Für alle Arten dieser Gattung ist das Vorkommen von Anthrachinonen typisch[2]. Der mengenmäßig wichtigste Anthrachinonbestandteil ist das Alizarin. Die Namensbildung (arab. al asara-saft)[3] weist auf die früheren Handelsbeziehungen hin. Die Konstitutionsaufklärung und anschließend durchgeführte Synthese des Alizarins durch Graebe und Liebermann[4] beendete die kommerzielle Auswertung des natürlichen Krapps.

Pharmakologisch wird die Bedeutung von Wurzelauszügen in der Urologie diskutiert[5]. Die Krappwurzel soll Einfluß haben auf die Korrosion magnesiumammoniumphosphathaltiger Harnsteine, daneben aber auch die Krampfbereitschaft in Niere und Harnleiter verhindern bzw. die Peristaltik erhöhen[1].

[+] Plinius d.Ä. Naturalis historia, Dioscurides, Arzneimittellehre

1) J. Keller, Pharmaz. 6, 675 (1951)
2) R. Hegnauer, Planta med. 7, 354 (1959)
3) H. Orth, Planta med. 9, 277 (1961)
4) C. Graebe u. C. Liebermann, Ber. dtsch. chem. Ges. 1, 49 (1868)
5) J. Keller und Görlich, Z.f.Urol. H 1 (1944)

I. BESCHRIEBENE BESTANDTEILE DER DROGE

Sechs Anthrachinonderivate werden in der Literatur als wichtige Inhaltsstoffe genannt, die teils frei, teils in glykosidischer Bindung in der Pflanze vorliegen:

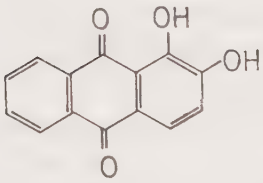
Alizarin, Purpurin, Purpuroxanthin, Purpuroxanthincarbonsäure (= Munjistin), Purpurincarbonsäure (= Pseudopurpurin) und Rubiadin.

Als Zuckerreste sind Glucose und Primverose, eine 6-β-D-Xylosido-D-glucose, beschrieben.

a) Freie Anthrachinone

Robiquet und Colin isolierten 1827 zwei Stoffe aus der Krappwurzel und nannten sie Alizarin und Purpurin[6]. Da die damals zur Verfügung stehenden Untersuchungsmethoden unzulänglich waren, wurden die Substanzen häufig mehrere Male entdeckt und verschieden benannt.

So tauchte Alizarin in den wissenschaftlichen Veröffentlichungen dieser Zeit unter verschiedenen Namen auf[7) - 10)], z.B. als Lizarinsäure[11)], bis 1868 Graebe und Liebermann die Konstitution klärten[4)], indem sie nach der v. Baeyer'schen Methode Alizarin mit Zinkstaub zu Anthracen reduzierten. Sie untersuchten daraufhin die Synthesemöglichkeiten, auf deren praktische Bedeutung sie schon

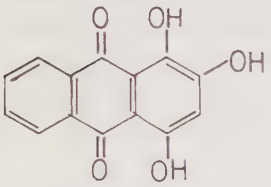


Alizarin

6) P.J. Robiquet u. J.J. Colin, A.ch. (2) 34, 225 (1827)
7) J. Wolff und A. Strecker, Liebigs Ann. Chem. 75, 1 (1850)
8) F. Rochleder, Liebigs Ann. Chem. 80, 321 (1851)
9) F. Rochleder, Liebigs Ann. Chem. 82, 205 (1852)
10) E. Schunck, Liebigs Ann. Chem. 66, 174 (1847)
11) H. Debus, Liebigs Ann. Chem. 66, 357 (1847)

bei der Konstitutionsaufklärung hingewiesen hatten[12]. Im selben Jahr noch stellten sie das erste "künstliche" Alizarin her, die erste Synthese eines im Pflanzenreich vorkommenden Farbstoffes[13].

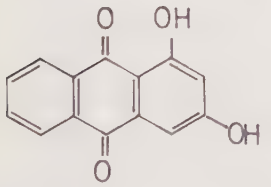
Das 1827 von Robiquet und Colin nicht völlig rein gewonnene Purpurin wurde 1834 rein von Runge isoliert und "Krappurpur" genannt. Es tauchte später unter dem Namen "Oxylizarinsäure" und "Verantin" in der Literatur auf[7) 11) 20]. 1864 gelang Stenhouse die Reindarstellung aus Rubia munjista. F. de Lalande stellte es 1874 zum ersten Mal synthetisch her[14]. Die Anordnung der drei Hydroxylgruppen konnte nach der Anthrachinonsynthese von A. v. Baeyer und H. Caro festgelegt werden (Umsetzung von 4-Chlorphenol mit Phthalsäureanhydrid zu Chinizarin und Oxydation des Chinizarins zu Purpurin)[15].



Purpurin

Da Alizarin ebenfalls zu Purpurin oxydiert werden kann, müssen die drei Hydroxylgruppen des Purpurins die 1, 2, 4-Stellung einnehmen.

Schützenberger und Schiffert isolierten 1865 aus der Krappwurzel ein Anthrachinon, welches sie Purpuroxanthin nannten[16]. Da sie kein reines Produkt erzielten, gelang es ihnen nicht, die Isomerie des gefundenen Stoffes mit Alizarin festzustellen. Die Bruttoformel wurde durch Rosenstiehl festgestellt[17]. Liebermann klärte 1876 die Konstitution auf[18]. Rosenstiehl und Liebermann gewannen Purpuroxanthin als Vergleichssubstanz zu dem natürlichen Produkt aus Umsetzung alkalischer Purpurinlösungen mit weißem Phosphor[17].

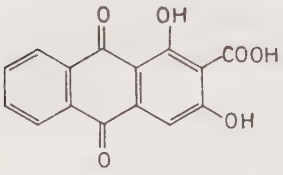


Purpuroxanthin

12) C. Graebe u. C. Liebermann, Ber. dtsch. chem. Ges. 2, 14 (1869)
13) C. Graebe u. C. Liebermann, Ber. dtsch. chem. Ges. 2, 332 (1869)
14) F. de Lalande, Ber. dtsch. chem. Ges. 7, 1545 (1874)
15) A. v. Baeyer u. H. Caro, Ber. dtsch. chem. Ges. 8, 152 (1875)
16) R. Schützenberger u. Schiffert, Bull (2) 4, 12 (1865)
17) A. Rosenstiehl, Ber. dtsch. chem. Ges. 7, 1547 (1874)
18) C. Liebermann, Liebigs Ann. Chem. 183, 145 (1876)
resp. 213

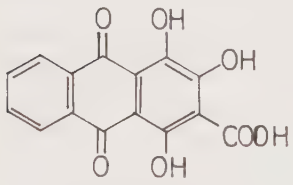
Die erste Synthese (aus 2,4-Dihydroxybenzoesäure) gelang Noah 1886[19].

1865 isolierte Stenhouse aus Rubia munjista eine Anthrachinoncarbonsäure, welche er "Munjistin" nannte[21]. Schunck und Roemer konnten 1877 aus dem natürlichen, rohen Purpurin eine Begleitsubstanz abtrennen, welche sie Purpuroxanthincarbonsäure nannten, denn sie zersetzte sich oberhalb 232° zu Purpuroxanthin und CO_2[22]. Bei ihren Untersuchungen stellten Schunck und Roemer fest, daß Munjistin und Purpuroxanthincarbonsäure identisch waren[23]. Eine Synthese stammte von Mitter und Biswas[24].



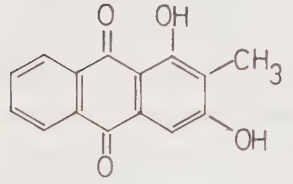
Purpuroxanthincarbonsäure

Neben Purpuroxanthin isolierten Schützenberger und Schiffert 1865 aus Rubia tinctorum ein Anthrachinon in geringer Menge, welches sie Pseudopurpurin nannten, da es in seinen chemischen Reaktionen dem Purpurin ähnlich war[16]. Unter dem Namen "ε-Purpurin" fand Rosenstiehl es 1876 erneut im Krapp[25] [26] und stellte die richtige Bruttoformel auf. Die Synthese gelang Mitter und Biswas aus 3-Methylalizarin[24].



Pseudopurpurin

1853 fand Schunck ein Anthrachinon im Krapp, welches er Rubiadin nannte, da die alkalische Lösung tiefrot gefärbt war[27]. Es gelang ihm jedoch nicht, diesen Stoff in genügender Menge und Reinheit aus der Droge abzutrennen. 1893 konnte Schunck zusammen mit Marchlewski ein



Rubiadin

19) E. Noah, Ber. dtsch. chem. Ges. 19, 332 (1886)
20) E. Schunck, Liebigs Ann. Chem. 81, 336, 348 (1852)
21) J. Stenhouse, Liebigs Ann. Chem. 130, 325 (1864)
22) E. Schunck u. H. Roemer, Ber. dtsch. chem. Ges. 10, 172 (1877)
23) E. Schunck u. H. Roemer, Ber. dtsch. chem. Ges. 10, 790 (1877)
24) P.C. Mitter u. H. Biswas, Ber. dtsch. chem. Ges. 65, 622 (1932)
25) A. Rosenstiehl, Ber. dtsch. chem. Ges. 9, 1808 (1876)
26) A. Rosenstiehl, Ber. dtsch. chem. Ges. 10, 734 (1877)
27) E. Schunck, Liebigs Ann. Chem. 87, 344 (1853)

Glykosid aus Krapp herauslösen, welches nach Hydrolyse Rubiadin ergab[28) 29)]. 1894 wurde die Konstitution aufgeklärt. Die erste Synthese veröffentlichten Mitter und Gupta 1928[30)]; sie gingen dabei von der p-Toluylsäure aus.

b) Anthrachinone in glykosidischer Bindung

In der Droge sind drei Anthrachinonglykoside aufgefunden worden:

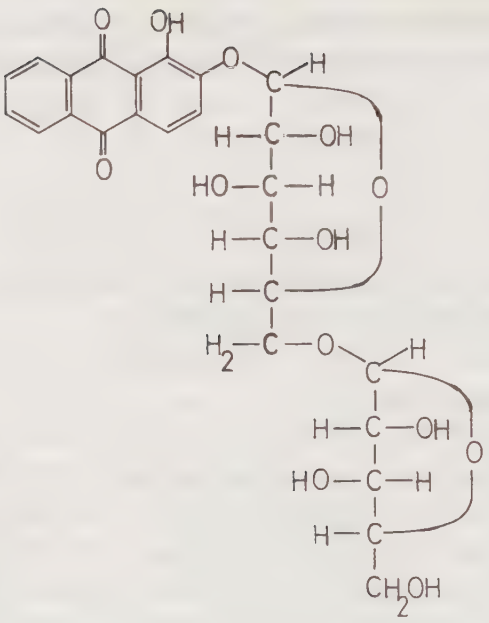
Alizarinprimverosid (= Ruberythrinsäure),

Purpurincarbonsäureprimverosid (= Galiosin)

und Rubiadinglucosid.

Aus der Wurzel konnte Schunck eine amorphe Substanz gewinnen, die er "Rubian" nannte (1847)[10)]. Rochleder gelang es wenige Jahre später kristallin ein Glykosid zu isolieren, welches bei der Hydrolyse in Alizarin und Zucker gespalten wurde[8)]. Nach der roten Färbung nannte er die Substanz in lateinisch-griechischer Übersetzung Ruberythrinsäure. Graebe und Liebermann konnten feststellen, daß bei Hydrolyse zwei verschiedene Zucker entstanden[31)].

28) E. Schunck u. L. Marchlewski, J. chem. Soc. (London) 63, 973 (1893)
29) E. Schunck u. L. Marchlewski, J. chem. Soc. (London) 65, 183 (1894)
30) P.C. Mitter u. P. Gupta, C. 1928 I, 2398
31) C. Graebe u. C. Liebermann, Liebigs Ann. Chem. Suppl. 7, 257, 296 (1869)



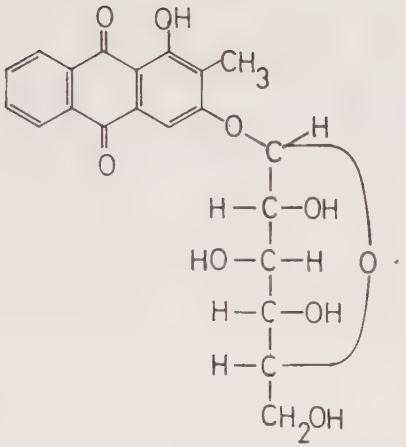
Alizarinprimverosid

Die Identität von Ruberythrinsäure mit "Rubian" bzw. "Rubiansäure" - wie Rubian bisweilen genannt wurde - entdeckten Liebermann und Bergami[32]. Jones und Robertson isolierten als Zucker Glucose und eine Pentose[33]. 1936 identifizierten Hill und Richter die Pentose als Xylose[34]. Richter konnte beweisen, daß die Primverose über den Sauerstoff in 2-Stellung mit dem Alizarin verbunden ist[35]. Die erste Synthese stammte von Zemplen und Bognár[36].

Schunck und Marchlewski isolierten 1893 Rubiadinglucosid aus der Krappwurzel und hydrolysierten es zu Rubiadin und Glucose[28) 29)].

---

32) C. Liebermann u. O. Bergami, Ber. dtsch. chem. Ges. 20, 2241 (1887)
33) E.T. Jones u. A. Robertson, J. chem. Soc. (London) 1933, 1167
34) R. Hill. u. D. Richter, Nature (London) 138, 38 (1936)
ref. C. 1936 II, 4013
35) D. Richter, J. chem. Soc. (London) 1936, 1701
36) G. Zemplen u. R. Bognár, Ber. dtsch. chem. Ges. 72, 913 (1939)

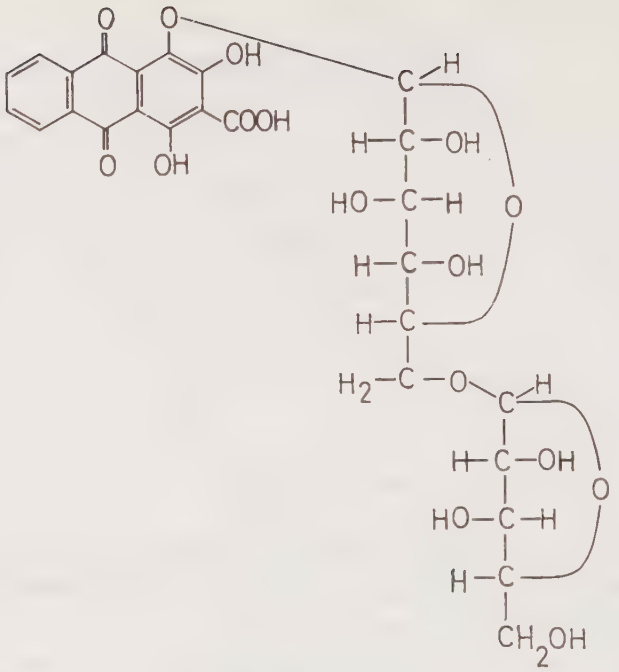


Rubiadinglucosid

Die erste Synthese stammte von Jones und Robertson. Sie konnten bei ihren Untersuchungen die 2-Stellung der Methylgruppe und die Bindung der Glucose an den Sauerstoff in 3-Stellung nachweisen[37].

Hill isolierte 1934 aus wildem Krapp (Rubia peregrina) und dem Labkraut (Galium verum) ein Anthrachinonglykosid, welches er "Galicid" nannte[38]. Bei der Hydrolyse wurde das Glykosid in Pseudopurpurin (Purpurincarbonsäure) und Primverose gespalten[34].

37) E. T. Jones u. A. Robertson, J. chem. Soc. (London) 1930, 1699
38) R. Hill, Nature (London) 134, 628 (1934)
ref. C. 1935 II, 1021



Galiosin

1934 bewiesen Hill und Richter die Verknüpfung der Purpurincarbonsäure in 1-Stellung mit der Primverose und nannten das Glykosid Galiosin[39].

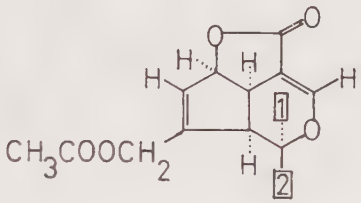
c) Anthrachinonfreie Inhaltsstoffe

Neben den unspezifischen "Bestandteilen" der Krappwurzel wie Citronensäure, Pektinen, Eiweißstoffen und Zucker enthält die Droge noch ein anthrachinonfreies Glykosid:

Es wurde zuerst 1851 von Rochleder sirupartig gewonnen und als "Rubichlorsäure" bezeichnet[8]. Schwarz fand sie 1852 auch in Galium aparine[40].

39) R. Hill u. D. Richter, J. chem. Soc. (London) 1936, 1714
40) R. Schwarz, Liebigs Ann. Chem. 83, 57 (1852)

Aus dem frischen Kraut des Waldmeisters (Asperula odorata) konnte Herissey 1925 ein Glykosid kristallin gewinnen, welches er Asperulosid nannte[41]. Ein Jahr darauf stellte er die Identität zwischen Rubichlorsäure und Asperulosid fest[42]. Die Bruttoformel wurde 1954 aufgestellt[43]. Briggs und Cain postulierten eine Konstitutionsformel, die jedoch durch spätere Untersuchungen widerlegt wurde[44]. Das Aglukon konnten sie nicht isolieren. Bei Hydrolyse schied das Glykosid ein schwarzes, polymerisiertes Aglukon ab. Grimshaw stellte nach eingehendem Studium der IR-Spektren von Asperulosid und von verschiedenen Reaktionsprodukten die wohl richtige Konstitutionsformel auf [45].



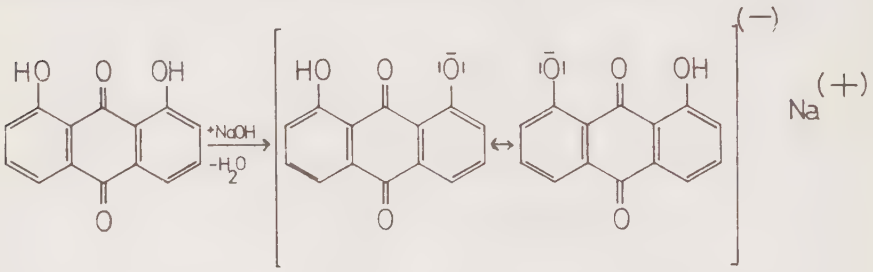
Asperulosid
(Glucose in [1] oder [2] Stellung)

Nach Betrachtung der Formel im Dreidingmodell können die Ringe nur cis-verknüpft sein. Die Struktur erinnert an die aus dem Baldrian neuerdings isolierten "Valtrate", die auch Cyclopentanopyrane sind.

41) H. Herissey, C.r. 180, 1695 (1925)
42) H. Herissey, J. Pharm. Chim. (8) 4, 481 (1926)
43) H. Lindsay, H. Briggs, G.A. Nicholls, J. chem. Soc. (London) 1954, 3940
44) H. Briggs u. B.F. Cain, J. chem. Soc. (London) 1954, 4182
45) J. Grimshaw, Chem. and Ind. 1961, 403
ref. C. 1964-39, 951

II. VERSUCHE ZUR BORNTRÄGER-REAKTION

Zur Bestimmung von Anthrachinonen bzw. Anthrachinonglykosiden benützt man allgemein die Bornträger-Reaktion: Nach Zugabe von Alkali färben sich Hydroxyanthrachinone je nach Substitution rot bis violett unter Ausbildung eines mesomeriefähigen Systems:



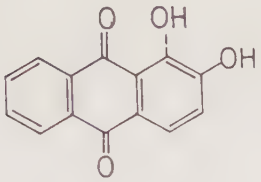
Die Messung erfolgt in den Maxima dieser Verbindungen zwischen 500 und 600 nm. Die Ausbildung des mesomeriefähigen Systems erreicht in der Regel nach ca. 30 Minuten ein Maximum. Temperatur- und Lichteinflüsse können diese Zeitspanne ändern. Die Laugenkonzentration kann die Stabilität des Farbkomplexes beeinflussen.

Auterhoff und Boehme[46) 47)] untersuchten den Einfluß dieser Faktoren. Sie bestimmten speziell den Einfluß auf 1,8-Dihydroxyanthrachinon bzw. das entsprechende Glucosid.

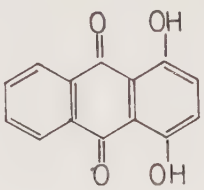
Bei der Reaktion von Anthrachinonen der Krappwurzel mit Lauge wurde nun festgestellt, daß die Faktoren Zeit und Stabilität sich anders auswirken, wenn Anthrachinone vorliegen, die mehrere Hydroxylgruppen am gleichen Ring tragen. Es wurde daher zunächst das Verhalten von 1,2-Dihydroxyanthrachinon (=Alizarin) (I), 1,4-Dihydroxyanthrachinon (=Chinizarin) (II), 1,2,4-Trihydroxyanthrachinon (=Purpurin) (III) und 1,2,5,8-Tetrahydroxy-

46) H. Auterhoff u. K. Boehme, Arch. Pharmaz. 301, 793 (1968)
47) K. Boehme, Inauguraldissertation Tübingen 1968

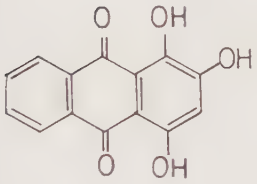
anthrachinon (=Chinalizarin) (IV) bei der Bornträger-Reaktion vergleichend untersucht.



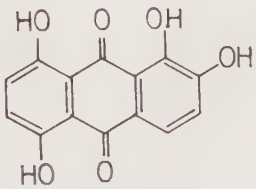
Alizarin (I)



CHINIZARIN (II)



Purpurin (III)



Chinalizarin (IV)

a) Stabilität der Rotfärbung

Beim Versetzen einer Lösung von 1, 2-Dihydroxyanthrachinon mit Laugengemisch DAB 7 ergibt sich folgende Kurve.

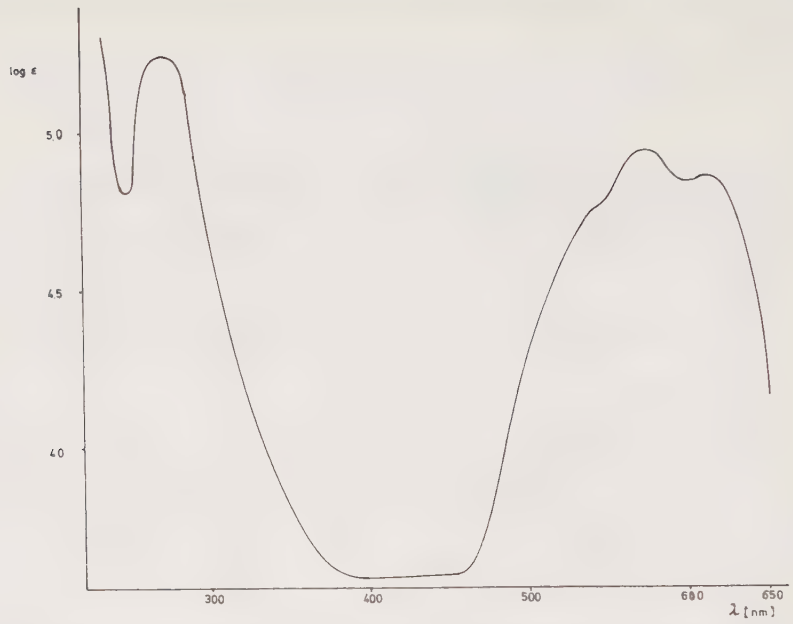


Abb. 1: Absorptionskurve von 1,2-Dihydroxyanthrachinon in Laugengemisch DAB 7

Im sichtbaren Bereich sind zwei Maxima der Kurve (570 nm + 610 nm), in denen eine Bornträgergehaltsbestimmung durchgeführt werden kann. Ein Vergleich der Extinktionswerte bei diesen Wellenlängen innerhalb von 6 Stunden ergab folgendes Bild.

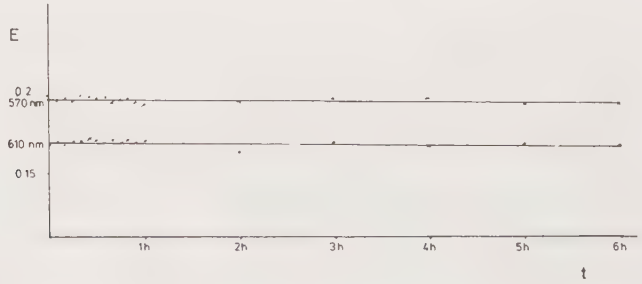


Abb. 2: Verhalten der Extinktion bei 570 und 610 nm einer Lösung von 1,2-Dihydroxyanthrachinon in Laugengemisch DAB 7

Bei Alizarin wird das Maximum der Extinktion praktisch sofort erreicht sowohl bei 570 nm als auch bei 610 nm. In beiden Fällen schwächen sich die Extinktionen so langsam ab (unter Lichtausschluß), daß nach 6 Stunden bei beiden Wellenlängen Werte gemessen werden können, die nur 2% unter den Höchstwerten liegen.

Lichteinfluß hatte auf den Extinktionsabfall keinen messbaren Einfluß. Das Aufbewahren der Meßlösung im Licht (bei normaler Laborbeleuchtung) und Bestrahlen mit UV-Strahlen ergab keinen stärkeren Abfall der Extinktionswerte als die Abbildung zeigt.

Bei der Umsetzung von 1,4-Dihydroxyanthrachinon mit Laugengemisch DAB 7 ergibt sich folgende Absorptionskurve.

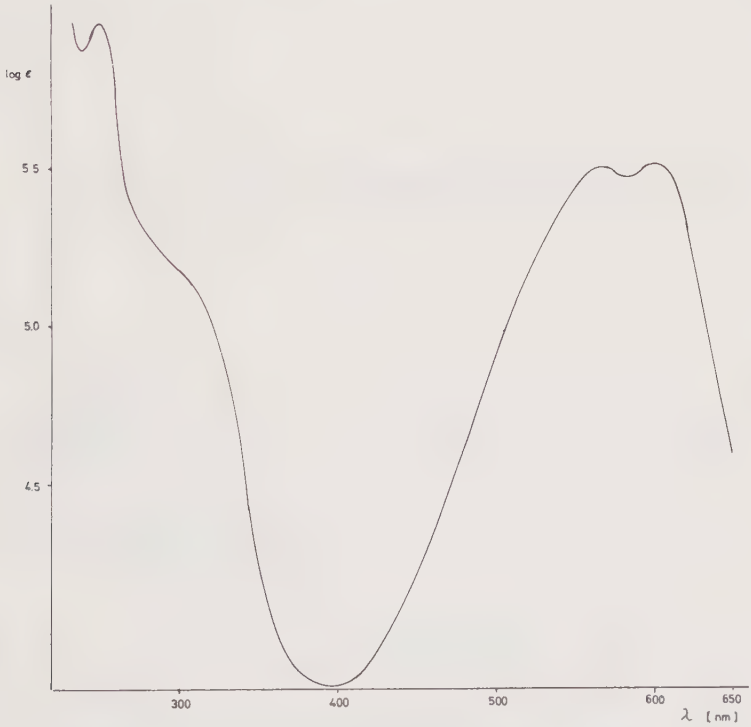
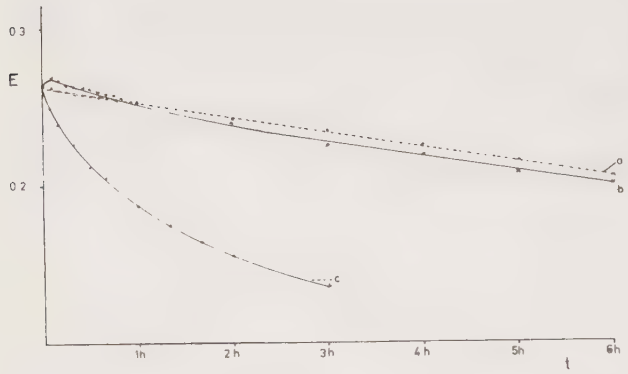


Abb. 3: Absorptionskurve von 1,4-Dihydroxyanthrachinon in Laugengemisch DAB 7

Die Maxima liegen bei den Wellenlängen 560 und 595 nm. Die entsprechende Messung der Extinktionswerte zeigt einen sofortigen Anstieg zu den Höchstwerten (innerhalb von 5 Minuten), dem ein merklicher Abfall der Extinktion folgt. Die Messung sechs Stunden nach Alkalisieren bei Aufbewahrung im Dunkeln zeigt nur noch 80 Prozent der anfänglichen Extinktion.

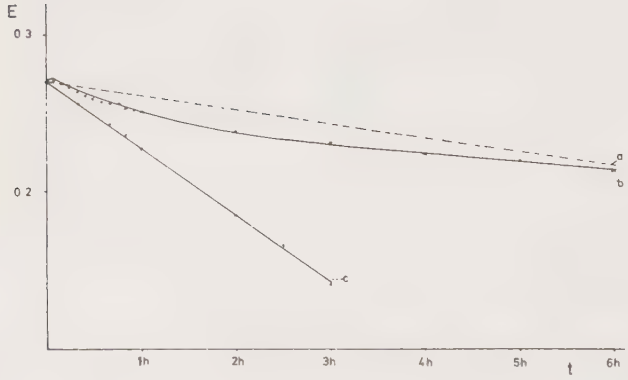


a) Aufbewahrung im Dunkeln

b) Aufbewahrung bei normaler Laborbeleuchtung

c) Bestrahlung mit UV-Strahlen

Abb. 4: Verhalten der Extinktion bei 560 nm einer Lösung von 1,4-Dihydroxyanthrachinon in Laugengemisch DAB 7



a) Aufbewahrung im Dunkeln

b) Aufbewahrung bei normaler Laborbeleuchtung

c) Bestrahlung mit UV-Strahlen

Abb. 5: Verhalten der Extinktion bei 595 nm einer Lösung von 1,4-Dihydroxyanthrachinon in Laugengemisch DAB 7

Bei Aufbewahrung der Meßlösung am Licht oder unter UV-Strahlung wird ein stärkerer Abfall der Extinktionswerte gemessen. Bei UV-Einwirkung fällt nach ca. 4 Stunden ein blauvioletter Niederschlag aus, der eine weitere Messung ungenau macht. Die Extinktionsmessung sechs bzw. vier Stunden nach Alkalizugabe ergibt Werte, die bei Lichteinwirkung noch ca. 75%, bei Bestrahlung noch 50% der Höchstwerte betragen.

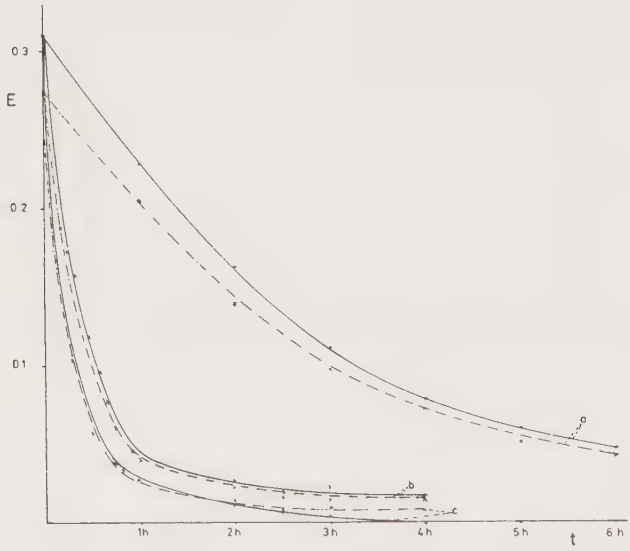
Bei Zugabe von Laugengemisch DAB 7 zu einer Lösung von 1, 2, 4-Trihydroxyanthrachinon wird die Kurve in Abb. 6 gemessen.

Abb. 6: Absorptionskurve von 1, 2, 4-Trihydroxyanthrachinon in Laugengemisch DAB 7

Beim Messen der Extinktion einer Purpurinlösung in Laugengemisch zeigt sich in den beiden Maxima (510 nm und 545 nm) folgendes: Die beiden Maxima werden sofort ausgebildet. Der Extinktionswert nimmt aber bei beiden Wellenlängen trotz Aufbewahrung im Dunkeln rasch ab. Sechs Stunden nach Alkalisieren beträgt der Wert nur noch ca. 15% der ursprüng-

lichen Extinktion. Infolge dieser schnellen Zersetzung der Farbe ist die Bornträger-Reaktion für eine Gehaltsbestimmung der Krappwurzel nicht zu verwenden, da Purpurin ein wesentlicher Bestandteil der Droge ist.

Werden die Meßlösungen bei Licht aufbewahrt oder wirken UV-Strahlen auf sie ein, so ist der Abfall der Extinktionswerte noch stärker. Vier Stunden nach Alkalizugabe können Werte gemessen werden, die bei Lichteinwirkung noch ca. 6%, bei UV-Einstrahlung noch ca. 1% der anfänglichen Werte betragen.



a) Aufbewahrung im Dunkeln

b) Aufbewahrung bei normaler Laborbeleuchtung

c) Bestrahlung mit UV-Strahlen

Abb. 7: Verhalten der Extinktion bei 510 (–•–•–) und 545 (———) nm einer Lösung von 1,2,4-Trihydroxyanthrachinon in Laugengemisch DAB7

Gibt man zu einer Lösung von 1,2,5,8-Tetrahydroxyanthrachinon Laugengemisch DAB 7, so erhält man folgende Absorptionskurve.

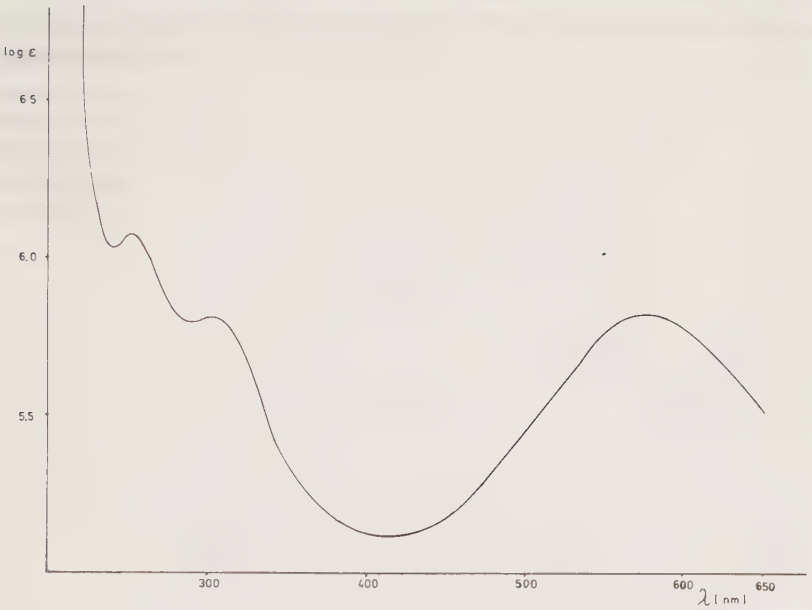


Abb. 8: Absorptionskurve von 1, 2, 5, 8-Tetrahydroxyanthrachinon in Laugengemisch DAB 7

Die Kurve zeigt im sichtbaren Bereich ein Maximum bei 570 nm. Innerhalb von mehreren Stunden nehmen die Extinktionswerte des Maximums rasch ab. Die Messung sechs Stunden nach Alkalisieren (Aufbewahrung im Dunkeln) ergibt einen Wert, welcher noch 33% des anfänglichen Extinktionswertes beträgt.

Bei Aufbewahrung der Meßlösung am Licht oder unter UV-Einstrahlung kann ein stärkerer Abfall der Extinktionswerte festgestellt werden. Sechs Stunden nach Zugabe des Laugengemisches betragen die Werte noch 20% bzw. bei UV-Einwirkung noch 18% der Höchstwerte.

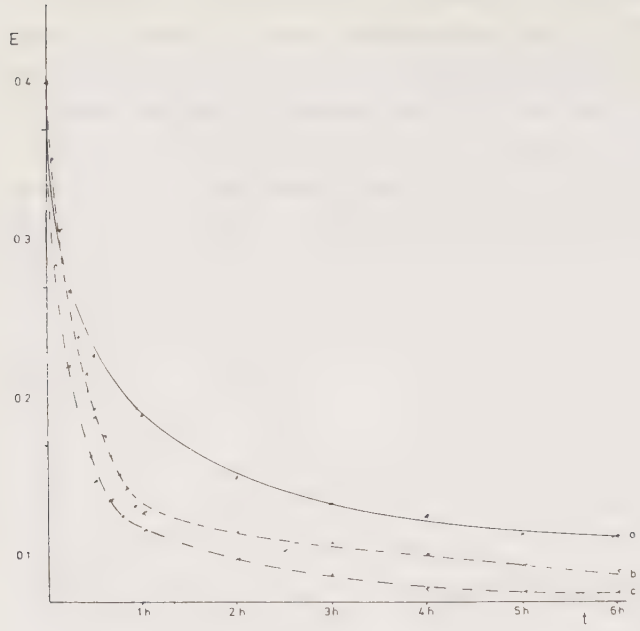


Abb. 9: Verhalten der Extinktion bei 570 nm einer Lösung von 1,2,5,8-Tetrahydroxyanthrachinon in Laugengemisch DAB 7

b) Farbbildung mit Natronlauge oder Ammoniak

Auterhoff und Boehme stellten fest, daß die Zugabe von Ammoniak zu einer Lösung von 1,8-Dihydroxyanthrachinon in Natronlauge ohne Einfluß auf Lage und Größe des Maximums ist; Ammoniak allein aber ergibt keine Phenolatbildung[46) 47)].

Wir untersuchten bei den vier hier berücksichtigten Anthrachinonen den Einfluß von Ammoniak bei Zugabe von 10 Äquivalenten Lauge.

Bei Zugabe von 10 Äquivalenten Natronlauge zu einer Alizarinlösung bilden sich die beiden Maxima aus (570 und 610 nm), die auch bei starkem Laugenüberschuß auftreten. In Ammoniak allein tritt bei 1,2-Dihydroxyanthrachinon nur ein Maximum bei 540 nm auf. Der Extinktionswert bei die-

ser Wellenlänge beträgt ca. 50% der mit Natronlauge erzielten Werte. Ammoniak genügt also ebenso wie bei 1,8-Dihydroxyanthrachinon nicht für die Phenolatbildung.

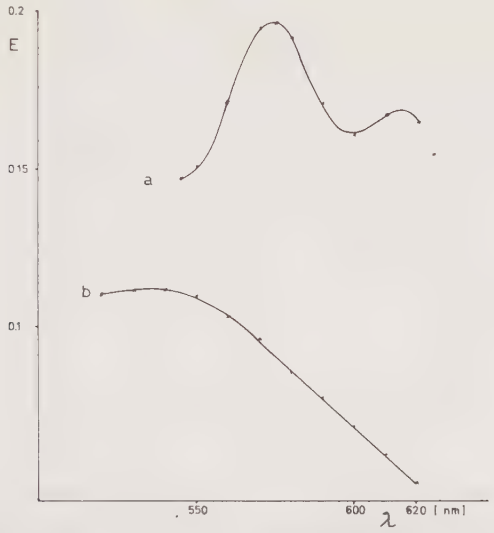


Abb. 10: Absorptionskurven des 1,2-Dihydroxyanthrachinons mit 10 Äquivalenten Natronlauge (a) oder Ammoniak (b)

Steht die zweite Hydroxylgruppe in 4-Stellung, so bietet sich ein ähnliches Bild. Die beiden Maxima, 560 und 595 nm, welche beim Alkalisieren mit 10 Äquivalenten Natronlauge auftreten, bilden sich bei Zugabe von Ammoniak allein nicht aus. Die Kurve der Bornträger-Reaktion mit Ammoniak besitzt ein Maximum bei 545 nm. Die hypsochrome Verschiebung beträgt nur die Hälfte des Wertes bei 1,2-Dihydroxyanthrachinon. Der Extinktionswert hat etwa 75% des mit Natronlauge gemessenen Wertes.

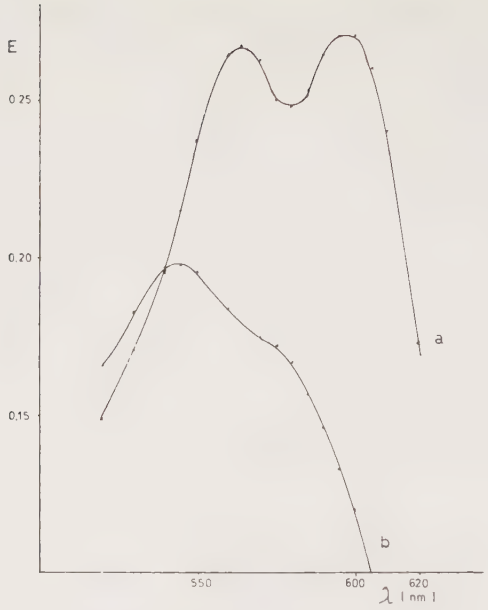


Abb. 11: Absorptionskurven des 1,4-Dihydroxyanthrachinons mit 10 Äquivalenten Natronlauge (a) oder Ammoniak (b)

Bei Substitution des Anthrachinons mit drei Hydroxylgruppen in 1,2,4-Stellung differieren die beiden Kurven in der Lage der Maxima nicht. Lediglich die Höhe der Extinktion ist verschieden. Bei Zugabe von Natronlauge ist das bathochrome Maximum (545 nm) stärker ausgebildet, bei Ammoniak das hypsochrome Maximum (510 nm). Die Extinktionswerte, gemessen in den Maxima der Kurve mit Ammoniak, betragen ca. 70 - 80% der entsprechenden Werte der Kurve mit Natronlauge.

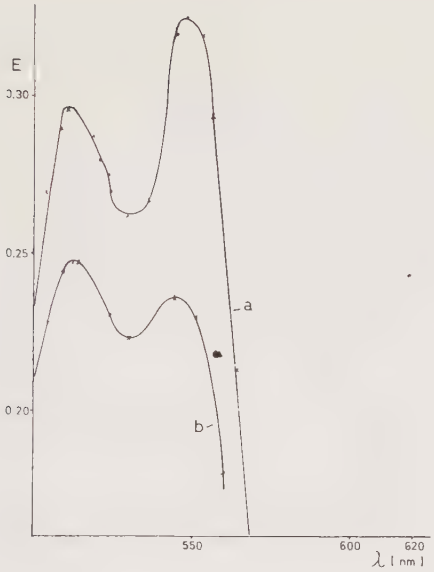


Abb. 12: Absorptionskurven des 1,2,4-Trihydroxyanthrachinons mit 10 Äquivalenten Natronlauge (a) oder Ammoniak (b)

Die beim Alkalisieren einer Lösung von 1,2,5,8-Tetrahydroxyanthrachinon mit 10 Äquivalenten Natronlauge erzielte Kurve zeigt fast dasselbe Bild wie beim Alkalisieren mit entsprechender Menge Ammoniak. Die Höhe der Extinktion ist lediglich verschieden.

Die Kurve mit Ammoniak ergibt in den Maxima 92% der Extinktionswerte der Kurve mit Natronlauge.

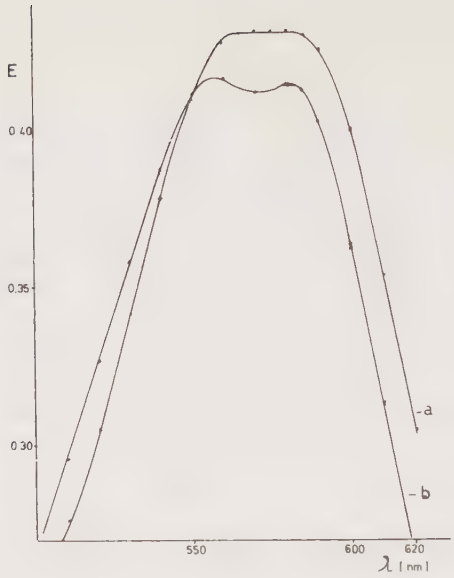


Abb. 13: Absorptionskurven des 1,2,5,8-Tetrahydroxyanthrachinons mit 10 Äquivalenten Natronlauge (a) oder Ammoniak (b)

c) Farbbildung bei Alkalisieren mit Natriummethylat

Bei Zugabe von 1 bis 10 Äquivalenten Natriummethylat zu einer 1,8-Dihydroxyanthrachinonlösung in wasserfreiem Methanol tritt eine bathochrome Verschiebung des Maximums um ca. 70 nm auf. Es wurde untersucht, welchen Einfluß auf den Kurvenverlauf diese Alkalisierung bei den vier hier untersuchten Anthrachinonen hat.

1,2-Dihydroxyanthrachinon zeigt bei Zugabe von einem Äquivalent Natriummethylat ein Maximum bei 525 nm. Ab Zugabe von 4 Äquivalenten bilden sich immer stärker die Maxima des ionisierten Alizarins aus.

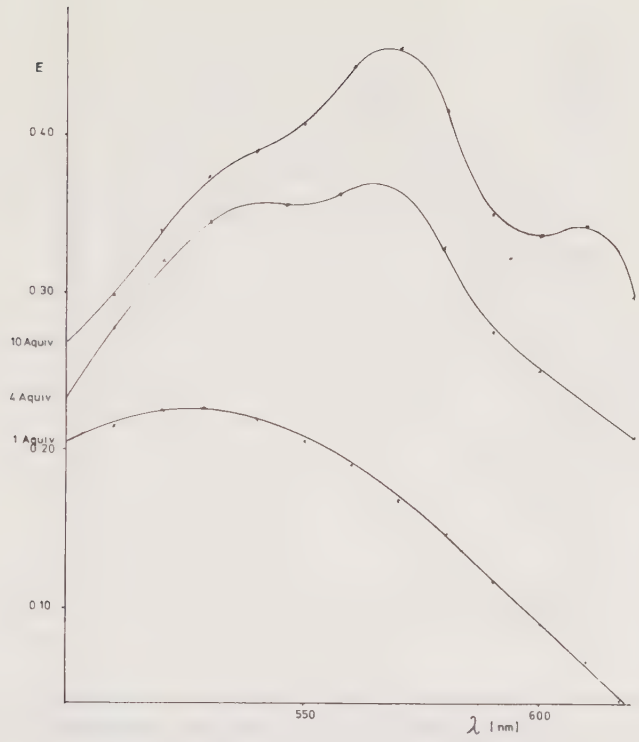


Abb. 14: Absorptionskurven des 1, 2-Dihydroxyanthrachinons mit verschiedenen Äquivalenten Natriummethylat

Die Kurve des 1, 4-Dihydroxyanthrachinons mit einem Äquivalent Natriummethylat hat ein Maximum bei 540 nm. Bei Zugabe von 2 Äquivalenten treten die Maxima bei 560 und 595 nm auf.

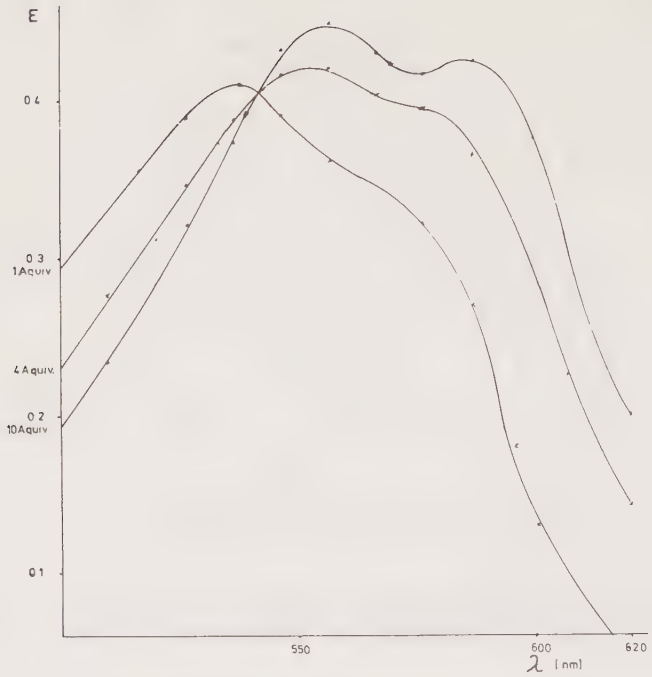


Abb. 15: Absorptionskurven des 1,4-Dihydroxyanthrachinons mit verschiedenen Äquivalenten Natriummethylat

1,2,4-Trihydroxyanthrachinon zeigt schon bei Zugabe von einem Äquivalent Natriummethylat die Kurve des ionisierten Purpurins.

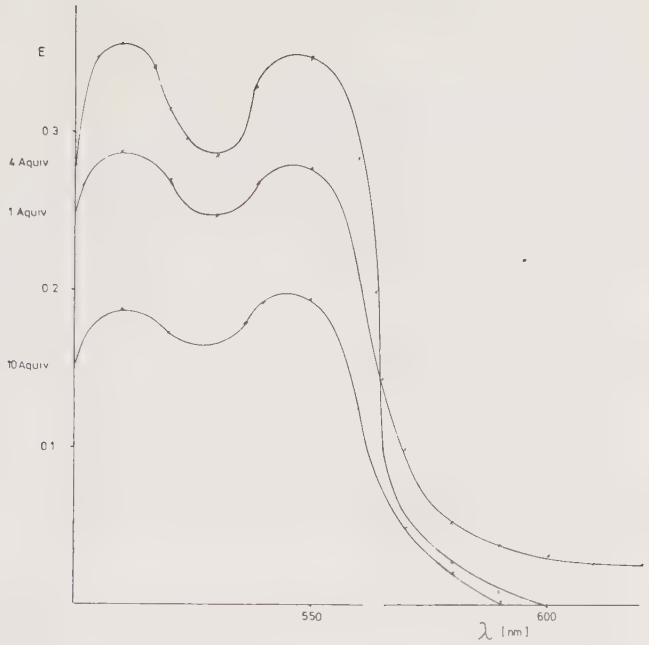


Abb. 16: Absorptionskurven des 1, 2, 4-Trihydroxyanthrachinons mit verschiedenen Äquivalenten Natriummethylat

Bei 1, 2, 5, 8-Tetrahydroxyanthrachinon tritt bei Zugabe von einem Äquivalent ein Maximum bei 550 nm auf. Werden zwei Äquivalente zugegeben, so sind die Extinktionswerte bei 550 und 580 nm gleich groß. Bei Zugabe von mehr Äquivalenten treten Werte auf, die tiefer liegen.

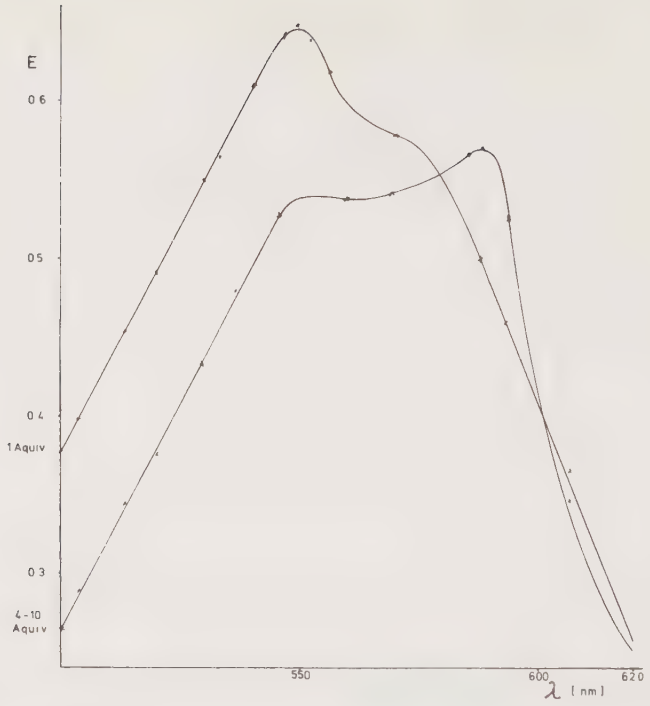
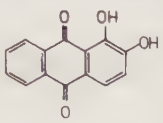
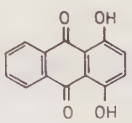
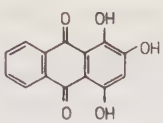
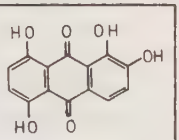


Abb. 17: Absorptionskurven des 1,2,5,8-Tetrahydroxyanthrachinons mit verschiedenen Äquivalenten Natriummethylat

Struktur				

Bornträger-Reaktion mit Laugengemisch DAB 7
(1 mg/100 ml; 50 ml MeOH p.a., 50 ml Laugengemisch)

Maxima	570 + 610	560 + 595	510 + 545	570
Ausbildung nach..min	5	5	sofort	sofort
Extinktion pro mg	0,19 0,17	0,26 0,27	0,27 0,31	0,43

Stabilität der Anthrachinon-Laugengemisch-Lösungen
(Prozent des Höchstwertes bei Messung nach 4 bzw. 6 Stunden)

% des Höchstwertes				
a) Dunkelheit	98%	80%	15%	33%
b) Licht	98%	75%	6%	20%
c) UV-Strahl.	98%	50% (4h)	1%	18%

Bornträger-Reaktion mit Natronlauge (a) oder Ammoniak (b)

Maxima a	570 + 610	560 + 595	510 + 545	570
b	540	545	510 + 545	560 + 580

Bornträger-Reaktion mit 1 - 10 Äq. Natriummethylat

Wellenlänge bei 1 Äq.	525	540	510 + 550	550
Verschiebung um.. nm	40 + 80	20 + 50	0	10 + 30
bei Zugabe von.. Äq.	4	2	0	3

d) Vergleich der Bornträger-Reaktion unter verschiedenen Bedingungen

Bei den vier untersuchten Anthrachinonen bildet sich spätestens nach 5 Minuten das Maximum aus.
Die Höhe der Extinktion bei Zugabe von Laugengemisch DAB 7 entspricht der Zahl und Stellung der Hydroxylgruppen. Am schwächsten ist sie bei 1, 2-Stellung; dann nimmt sie zu über 1, 4- und 1, 2, 4-Stellung zu der höchsten Extinktion, die bei 1, 2, 5, 8-Stellung der Substituenten gemessen werden konnte.

Zur Phenolatbildung genügen bei 1, 2-Dihydroxy- und 1, 4-Dihydroxyanthrachinon 10 Äquivalente Ammoniak nicht. Bei 1, 2, 4-Trihydroxy- und 1, 2, 5, 8-Tetrahydroxyanthrachinon ist diese Alkalimenge ausreichend. Alkalisieren in wasserfreiem Milieu mit einem Äquivalent Natriummethylat ergibt bei drei Anthrachinonen (außer 1, 2, 4-Trihydroxyanthrachinon) das Maximum der nicht ionisierten Verbindung. Bei Zugabe von 2 - 4 Äquivalenten treten die Maxima der ionisierten Verbindungen auf.

Die Rotfärbung des 1, 2-Dihydroxyanthrachinons mit Laugengemisch ist selbst bei UV-Einstrahlung konstant. Die Bornträger-Lösungen der drei übrigen Verbindungen sind labiler; 1, 4-Dihydroxyanthrachinon ist in Lauge nur wenig labiler als 1, 8-Dihydroxyanthrachinon; am schnellsten zersetzt sich 1, 2, 4-Trihydroxyanthrachinon.

III. GEHALTSBESTIMMUNG DER DROGE

a) Methodik

Nach Untersuchung der Faktoren Extinktionshöhe und Stabilität der Färbung der Bornträger-Reaktion mit Alizarin und Purpurin, den beiden Hauptinhaltsstoffen der Krappwurzel, wurde versucht, Eichkurven aufzustellen. Bei Alizarin wurde die Extinktionsmessung jeweils 50 Minuten nach Laugenzugabe durchgeführt, einer Zeitspanne, in welcher nach den Vorversuchen auch höhere Konzentrationen sicher ein Intensitätsmaximum ausbildeten.

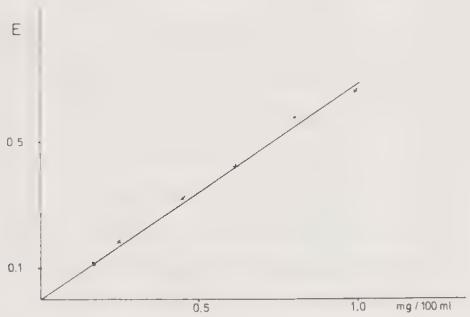


Abb. 18: Eichkurve der Alizarin-Bornträger-Lösung (gemessen 50 Min. nach Laugenzugabe und Aufbewahrung im Dunkeln)

Mit Purpurin ließ sich aber keine Eichkurve der Bornträger-Reaktion aufstellen. Trotz rascher Messung der Extinktion, was auf Grund der Vorversuche erforderlich war, konnten keine einheitlichen Werte erzielt werden. Außerdem zeigte sich bei der Untersuchung von Aglukon- und Glykosidlösungen der Krappwurzel, daß der Lichteinfluß ausgeprägter war als bei der reinen Alizarinlösung. Selbst das kurze Einwirken des Gerätelichtstrahles bei der Messung hatte auch bei schnellster Ablesung der Extinktion eine Erniedrigung der Werte zur Folge. Eine Gehaltsbestimmung mit

Hilfe der Bornträger-Reaktion kam daher bei den Rubia-Inhaltsstoffen nicht in Frage.

Ein Vergleich der UV-Spektren von Alizarin, Purpurin und Purpuroxanthin, des 1,3-Dihydroxyanthrachinons, eines mengenmäßig geringeren Bestandteils der Droge, ergab, daß Alizarin bei 248 nm ein Maximum besitzt, dessen Extinktionskoeffizient größer ist als der dieser beiden anderen Anthrachinone.

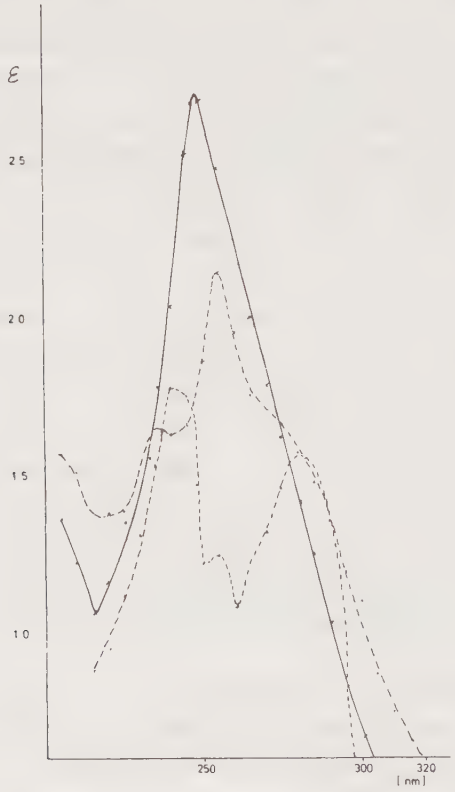


Abb. 19: Absorptionskurven von Alizarin (——), Purpurin (—·—·—) und Purpuroxanthin (----)

Mit Alizarinlösungen verschiedener Konzentration wurde daher für die Wellenlänge 248 nm eine Eichkurve aufgestellt.

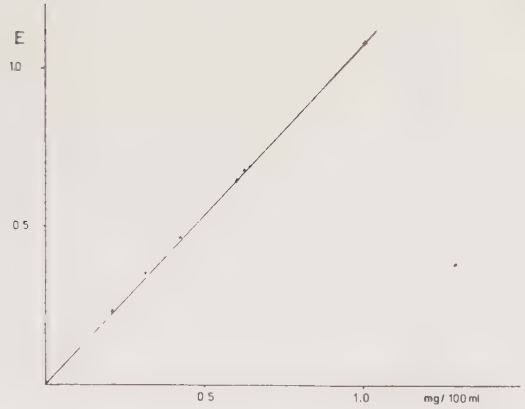
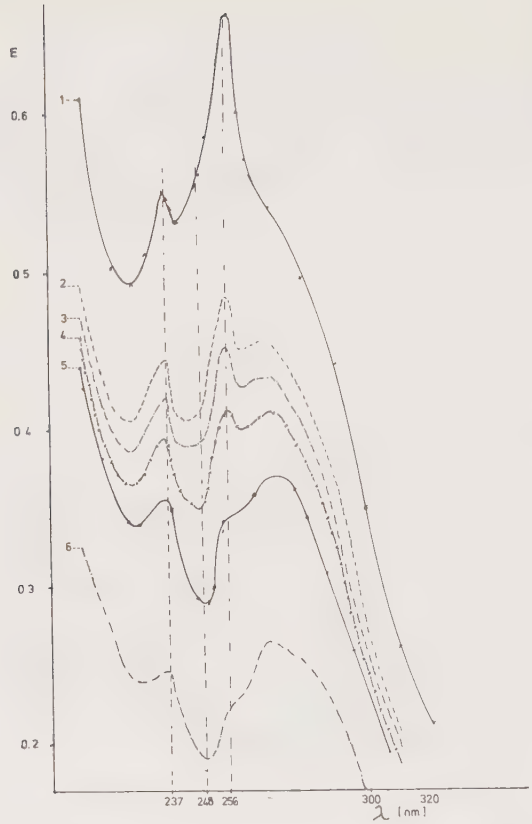


Abb. 20: Alizarin in Methanol, gemessen bei 248 nm

Das Purpurin ist laut Dünnschichtchromatogramm der zweitwichtigste Bestandteil. Das Maximum der Absorption liegt bei 256 nm. Wir stellten daher durch Lösungen verschiedener Konzentration eine Eichgerade auf, die jedoch bei geringen Konzentrationen nicht mehr linear verlief. Aufzeichnen der UV-Kurven ergab folgendes Bild (Abb. 21). Durch Wasserstoffbrückenbindung trat eine Abflachung des Maximums bei geringen Konzentrationen ein. Das Maximum bei 237 nm blieb dagegen erhalten.



1 - 0,7 mg/100 ml
2 - 0,56 mg/100 ml
3 - 0,53 mg/100 ml
4 - 0,49 mg/100 ml
5 - 0,42 mg/100 ml
6 - 0,28 mg/100 ml

Abb. 21: Absorptionskurven verschiedener Purpurinkonzentrationen

Da die Messung bei 256 nm also ungünstig war, wurde für die Gehaltsbestimmung die Messung bei 237 nm durchgeführt. Bei dieser Wellenlänge wurde auch bei geringen Mengen das Maximum weder verdeckt noch verschoben. Nach üblicher Methode stellten wir eine Eichkurve auf.

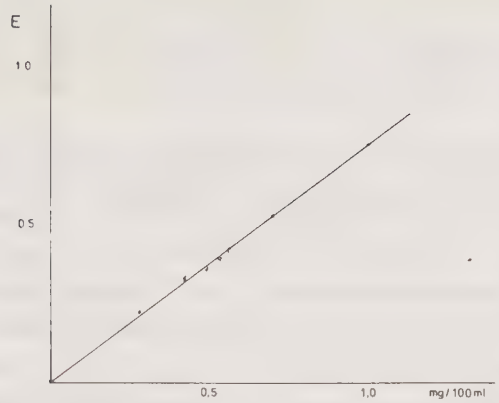


Abb. 22: Purpurin in Methanol, gemessen bei 237 nm

Ein Gehalt an Purpurin könnte einen höheren Alizaringehalt vortäuschen. Wir suchten daher eine Methode, Purpurin neben Alizarin zu bestimmen. Eine Messung bei 237 nm und bei 248 nm ergab nur Annäherungswerte, da die Absorptionen beider Anthrachinonderivate sich überschneiden (vgl. Abb. 19, S. 30).

Aus der Extinktion einer Lösung kann man den Gehalt bestimmen, wenn der Extinktionsfaktor der enthaltenen Substanz bei dieser Wellenlänge bekannt ist. Entsprechend kann man bei einer Lösung mit zwei Bestandteilen den jeweiligen Gehalt bestimmen, wenn die Extinktionsfaktoren beider Stoffe für zwei Wellenlängen bekannt sind, in welchen jeweils ein Stoff ein Maximum besitzt.

Es gelten folgende Gleichungen:

für das Maximum des einen Stoffes bei x nm

$$E_x = \varepsilon_{x1} \cdot c_1 + \varepsilon_{x2} \cdot c_2$$

für das Maximum des zweiten Stoffes bei y nm

$$E_y = \varepsilon_{y1} \cdot c_1 + \varepsilon_{y2} \cdot c_2$$

Hier kann man für x und y 237 und 248 einsetzen, für 1 und 2 Alizarin (= A) und Purpurin (= P).

$$E_{237} = \varepsilon_{A237} \cdot c_A + \varepsilon_{P237} \cdot c_P \qquad (1)$$

$$E_{248} = \varepsilon_{A248} \cdot c_A + \varepsilon_{P248} \cdot c_P \qquad (2)$$

Einsetzen der Gleichung (1) in (2) oder umgekehrt ergibt die Möglichkeit c_A oder c_P zu bestimmen, wenn die entsprechenden Extinktionsfaktoren bestimmt sind.

Analog läßt sich aus einer Lösung bekannten Gehaltes an beiden Stoffen die Berechnung der Extinktionsfaktoren durchführen.

z.B. $E_{248} = \varepsilon_{A248} \cdot c_A + \varepsilon_{P248} \cdot c_P$

E_{248} wird im Photometer gemessen, c_A und c_P werden aus dem Gehalt berechnet; ebenso kann ε_{A248} aus der Extinktion reiner Alizarinlösungen berechnet werden. Die einzige Unbekannte ε_{P248} ergibt sich dann aus obiger Gleichung. Extinktionsmessungen verschiedener Alizarin-Purpurinlösungen verschiedener Zusammensetzung bei 237 nm und 248 nm ergaben für die Extinktionsfaktoren folgende Mittelwerte:

$$\varepsilon_{\text{Alizarin 237}} = 18\,900$$

$$\varepsilon_{\text{Alizarin 248}} = 25\,500$$

$$\varepsilon_{\text{Purpurin 237}} = 17\,300$$

$$\varepsilon_{\text{Purpurin 248}} = 17\,150$$

(Berechnung der Extinktionsfaktoren vgl. Experimenteller Teil)

Zur Kontrolle wurden die Faktoren in die Gleichungen, aus denen sie ermittelt wurden, eingesetzt und so rechnerisch die Extinktion ermittelt und mit dem am Gerät abgelesenen Wert verglichen. Die gemessenen und gerechneten Werte bei der Wellenlänge 237 nm stimmten vollkommen überein; bei 248 nm war die Differenz gering. Zur Kontrolle der aus den UV-Spektren errechneten Extinktionsfaktoren bestimmten wir dünnschichtchromatographisch das Verhältnis Alizarin zu Purpurin in der Droge.

Zur quantitativen Bestimmung wurde eine gewogene Menge Aglukonextrakt auf eine Kieselgel G Platte aufgetragen und entwickelt. Die Alizarinzone wurde quantitativ abgeschabt und im Soxhlet mit Äther extrahiert. Die Ätherlösung wurde zur Trockne eingeengt. Der in Methanol gelöste Rückstand wurde mit Methanol umgelöst und die Absorption bei 248 nm gemessen. Die restlichen Zonen der DC Platte wurden ebenso abgehoben und aufgearbeitet.

Durch gelöste Bestandteile des Sorptionsmittels ("silicagel blancs"), wurde jedoch die Extinktion der Lösungen erhöht, so daß die Bestimmung bedeutend höhere Substanzmengen ergab, als tatsächlich aufgetragen wurden.

In der Literatur sind verschiedene Methoden beschrieben, bei quantitativen Bestimmungen aus Kieselgel die "silicagel blancs" zu entfernen. Durch Vorreinigen des pulverförmigen Sorptionsmittel im Soxhlet mit achtstündiger Methanolextraktion ist nach Gänshirt eine Verringerung der Streulichtwerte zu erzielen[48]. Die Eigenabsorption des Sorptionsmittels war bei 225 nm auf die Hälfte gesunken. Bei 240 nm war jedoch der Erfolg geringer.

Die meisten Autoren messen die Extinktion ihrer Substanzlösung gegen eine ähnlich hergestellte Blindlösung. Aus einer Kieselgel Platte derselben Schichtdicke werden nach dem Entwickeln mit demselben Fließmittel wie bei der zu bestimmenden Probe Kieselgelzonen derselben Breite und desselben Rf-Wertes herausgeschabt und wie die Probe aufgearbeitet, z. B.[49)-51)].

Das Zentrifugieren der Meßlösungen ergab bei zweistündiger Dauer und 4000 U/min keinen Abfall der Extinktionswerte trotz hohen Gehaltes an gelösten Sorptionsmittelsbestandteilen[49) 50) 52)].

Es erschien uns günstig, die zur Bestimmung benützten Kieselgel G Platten durch Vorbehandlung zu präparieren. Durch Entwickeln mit Methanol, dem späteren Lösungsmittel für die Substanz, sollten die "silicagel blancs" an die Lösungsmittelfront gewaschen werden. Dieser Vorgang wurde mehrmals wiederholt.

Die Stoffe wurden nicht im Soxhlet extrahiert, da laut Stahl eine Soxhletextraktion zuviel störende Sorptionsstoffe aus dem Sorptionsmittel herauslöse[53)]. Durch 10minütiges Rühren mit dem Magnetrührer könne

---

48) H. Gänshirt u. K. Morianz, Arch. Pharmaz. 293/65, 1065 (1960)
49) Gänshirt, Koss u. Morianz, Arzneimittel-Forsch. 10, 943 (1960)
50) F. Schlemmer u. E. Link, Pharmaz. Ztg. 104, 1349 (1959)
51) H. L. Bird, Analytic. Chem. 35, 346 (1964)
52) P. Haefelfinger, Arch. Pharmaz. 297, 641 (1964)
53) E. Stahl, Dünnschichtchromatographie, 2. Aufl. Springer-Verlag, Berlin 1967

derselbe Substanzanteil wie bei der Soxhletextraktion herausgelöst werden ohne Nebenerscheinungen.

Die Extinktionsmessung der Lösungen, welche die aus den Platten gewonnenen Anthrachinonzonen enthielten, ergab folgende Werte:

Anthrachinon	Extinktion	Gehalt mg/ 51 mg Droge
Ätherischer Drogenextrakt		
Alizarin als Aglukon	0,047	0,04 mg
Purpurin als Aglukon	0,045	0,06 mg
Hydrolysierter Drogenextrakt ohne freie Anthrachinone		
Alizarin	0,092	0,09 mg
Purpurin	0,010	0,01 mg

Das Verhältnis Alizarin : Purpurin in der Droge beträgt in der Aglukonfraktion 1 : 1,5 - in der Glykosidfraktion 9 : 1.

b) Gehalt der Droge

Zur Gehaltsbestimmung wurden die Aglukonanteile in der Wurzel durch Ätherextraktion der Droge im Soxhlet entfernt. Mit Methanol wurde die Wurzel dann erschöpfend extrahiert (Glykosidextrakt). Die Methanollösung wurde zur Trockne eingeengt und mit verdünnter Salzsäure hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde mit Äther ausgeschüttelt, der Äther abgezogen und der Rückstand in Methanol aufgenommen. Die UV-Absorptionskurve des Methanolextraktes zeigte ebenso wie die Kurve des hydrolysierten Extraktes das typische Maximum des Alizarins bei 248 nm.

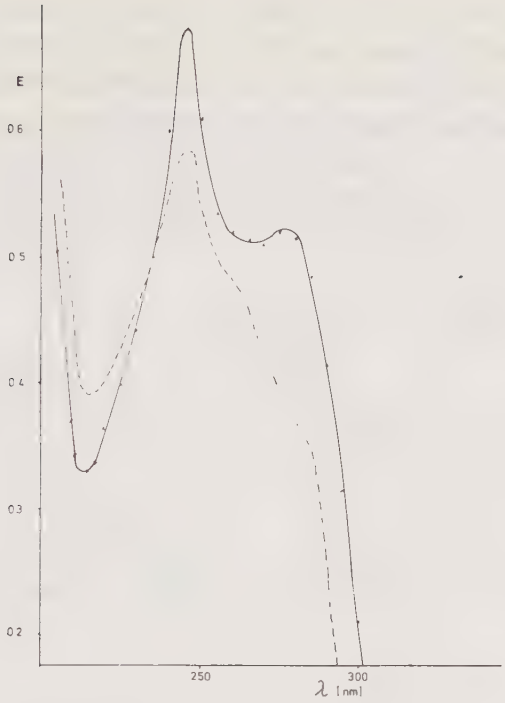


Abb. 23: Absorptionskurve des Glykosidextraktes (_·_·_) und des hydrolysierten Glykosidextraktes (——), gemessen in Methanol

Durch Extinktionsmessung bei dieser Wellenlänge wurde der Gehalt bestimmt. Berechnete man auf Alizarin, so ergab die Messung einen Gehalt von

1,1%, bezogen auf Alizarin

bzw. 2,5%, bezogen auf Alizarinprimverosid

Extinktionsmessung bei den Wellenlängen 237 und 248 nm und Umrechnung auf Alizarin und Purpurin führte zu folgenden Werten:

1,06%, bezogen auf Alizarin

2,2 %, bezogen auf Alizarinprimverosid

und 0,3 %, bezogen auf Purpurin

0,45%, bezogen auf Purpuringlucosid

Extrahiert man die Droge mit Äther, so erhält man ein rohes Aglukongemisch, dessen UV-Absorptionskurve (gemessen in Methanol) keine typischen Maxima zeigt. Messung bei 237 und 248 nm und Umrechnung nach Seite 34 ergab einen Gehalt an Alizarin von 0,1%, an Purpurin von 0,15%. Dieses Verhältnis stimmt mit DC überein (Seite 36). Der Rückstand wog 0,31 mg (berechnet auf 100 mg Droge), so daß die ermittelten Werte wahrscheinlich sind.

Zusammenstellung der ermittelten Werte

	Alizarin	Purpurin
Aglukongehalt	0,1%	0,15%
Glykosidgehalt (bezogen auf Glykosid)	2,2% -primverosid	0,45% -glucosid
(bezogen auf freies Aglukon)	1,1%	0,3%

IV. ZUORDNUNG DER GLYKOSIDE ZU DEN AGLUKONEN

Ein glykosidhaltiger Extrakt wurde dünnschichtchromatographisch untersucht.

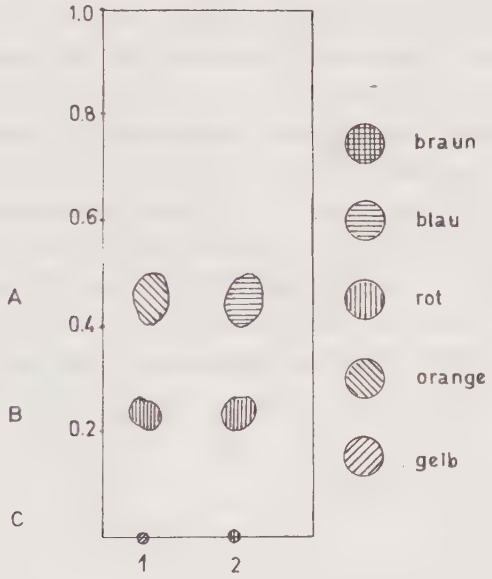


Abb. 24: DC Bild des glykosidhaltigen Extraktes.
Polyamidplatte; Fließmittel: Äthylacetat: Methanol: Wasser = 62 : 23 : 15
1 - bei Tageslicht
2 - nach Besprühen mit methanolischer Kalilauge

Zur Chromatographie eigneten sich hierfür nur Polyamidplatten, da auf Kieselgel G Platten papierchromatographisch reine Glykosidlösungen durch eine Vielzahl von Punkten eine Zersetzung anzeigten. Eine präparative Trennung auf Polyamidplatten war zu umständlich, da die Platten nur mit

wenig Substanz belastet werden können. Wir trennten daher auf einer Polyamidsäule. Mit dem Fließmittel Äthanol erhielten wir Stoff A, welcher bei Fortdauer der Entwicklung zunehmend mit Stoff B verunreinigt war. Auch mit Methanol konnten danach keine Substanzmengen aus der Säule gelöst werden. In der obersten Zone der Säule war Substanz C adsorbiert, die sich im Soxhlet nur in Spuren aus dem Polyamid herauslösen ließ. A und B konnten auf einer Sephadex G 25 Säule vollständig rein gewonnen werden.

Nach Hydrolyse beider Glykosidlösungen wurden die ätherischen Aglukon-Lösungen chromatographiert. Auch hierfür wurden Polyamidplatten verwandt, da beim Besprühen mit methanolischer Kalilauge die Krappanthrachinone ein unterschiedliches Verhalten zeigten. Alizarin färbte sich unter diesen Bedingungen blau. Purpurin, mengenmäßig an zweiter Stelle, färbte sich rot. Zur Unterscheidung ist dies wichtig, da bei großen Mengenunterschieden an Alizarin und Purpurin ihre Flecke leicht ineinander übergehen. Aglukon-A zeigte die typische Alizarinfärbung beim Besprühen, auch das Glykosid hatte sich beim Besprühen schon blau gefärbt. Aglukon-B zeigte überraschenderweise zwei Anthrachinonflecke, die direkt übereinander lagen. Dieselben Flecke traten auch bei einem synthetischen Rubiadin auf.

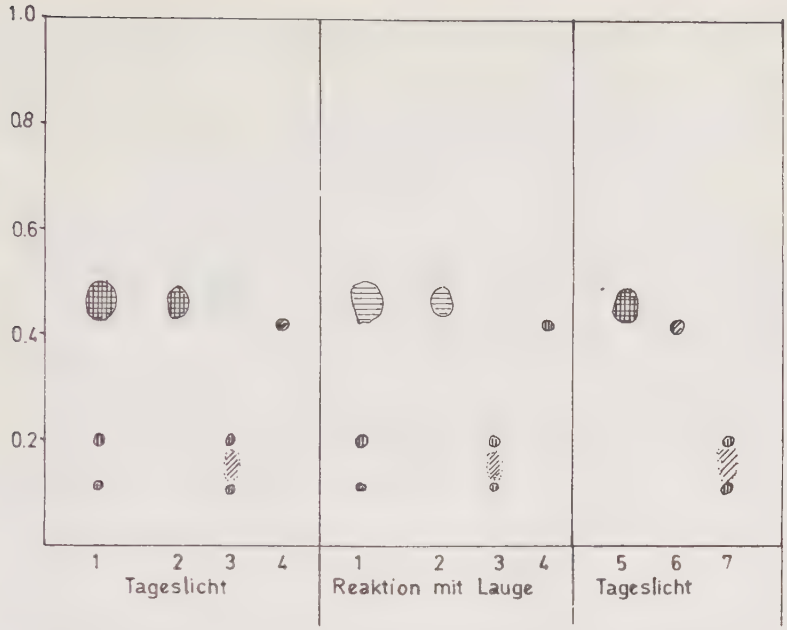


Abb. 25: Dünnschichtchromatogramm der hydrolysierten Glykosidlösungen

1 - hydrolysierter Glykosidextrakt
2 - Aglukon A
3 - Aglukon B
4 - Aglukon C
5 - Alizarin
6 - Purpurin
7 - synthet. Rubiadin

Beim Ausschütteln mit Natriumhydrogencarbonatlösung blieb der Stoff mit Rf 0,21 in der Ätherphase. Es handelte sich also hierbei um Rubiadin. Die Substanz mit Rf 0,12 könnte Purpuroxanthincarbonsäure sein.

Zur Identifizierung der Zucker wurden die sauren, wäßrigen Lösungen der Glykosidhydrolyse schonend am Rotationsverdampfer eingeengt. Sie wurden mehrere Male in wenig, wasserfreiem Pyridin aufgenommen und chromatographiert. Als Vergleichssubstanzen wurden Glucose und Xylose aufgetragen.

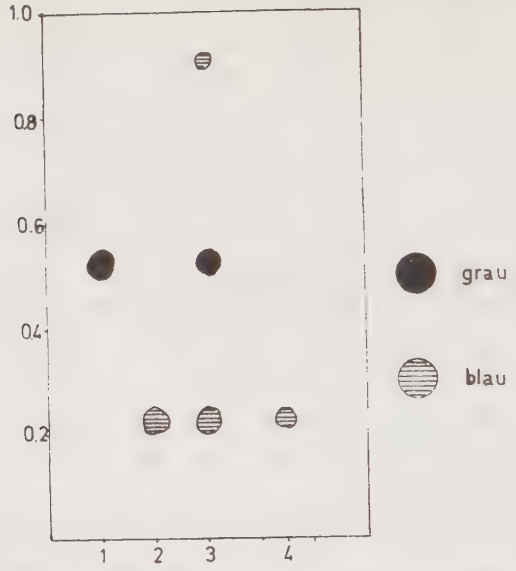


Abb. 26: Dünnschichtchromatogramm der Zuckerlösungen
1 - Xylose
2 - Glucose
3 - Zucker aus Glykosid A
4 - Zucker aus Glykosid B

Kieselgur G Platte, mit Natriumacetat gepuffert
Fließmittel: Äthylacetat 65
Isopropanol 23,5
Wasser 11,5
Sprühmittel: Anisaldehyd-Schwefelsäure
Sichtbarmachung: 5 - 10 Minuten bei 100 - 105° C

Aus der Dünnschichtchromatographie ging eindeutig hervor, daß Glykosid A aus Alizarin, Xylose und Glucose bestand. Der Fleck Rf 0,92 entsprach der Primverose. Dieser Fleck trat nur bei kurzdauernder Hydrolyse auf. Hydrolysierte man dieselbe Zuckerlösung ein zweites Mal, so traten nur noch die Xylose- und Glucose-Flecke auf. Zum Vergleich wurden die Zuckerlösungen der Papierchromatographie unterworfen. Es wurde 10 - 12 Stunden absteigend entwickelt. Als Sprühlösung diente eine TTC-Lösung und eine Anilinphthalat-Lösung. Die TTC-Lösung war hier nicht so geeignet. Sie färbte die Zuckerflecke nur dunkler als das Papier, differenzierte aber nicht mit

der Färbung. Mit Anilinphthalat-Lösung färbten sich Glucose braun, Xylose dunkelrot. Diese Färbungen gestatteten so eine exakte Unterscheidung.

Glykosid B enthielt als Aglukon Rubiadin, wie ein dünnschichtchromatographischer Vergleich mit dem synthetischen Produkt zeigte. Der Zucker konnte als Glucose identifiziert werden.

Glykosid C konnte nur in Spuren aus dem Polyamid herausgelöst werden. Auf Polyamidplatten chromatographiert, hatte das Aglukon denselben Rf-Wert (0,43) wie Purpurin. Als Zucker konnte Glucose nachgewiesen werden. Ob noch ein weiterer Zucker in Glykosid C enthalten war, konnte nicht nachgewiesen werden.

Burnett und Thomson[54] stellten fest, daß bei ein Jahr alter Krappdroge nur vier Anthrachinone frei oder als Glykosid vorkommen: Alizarin, Rubiadin, Purpurin und Purpurincarbonsäure.

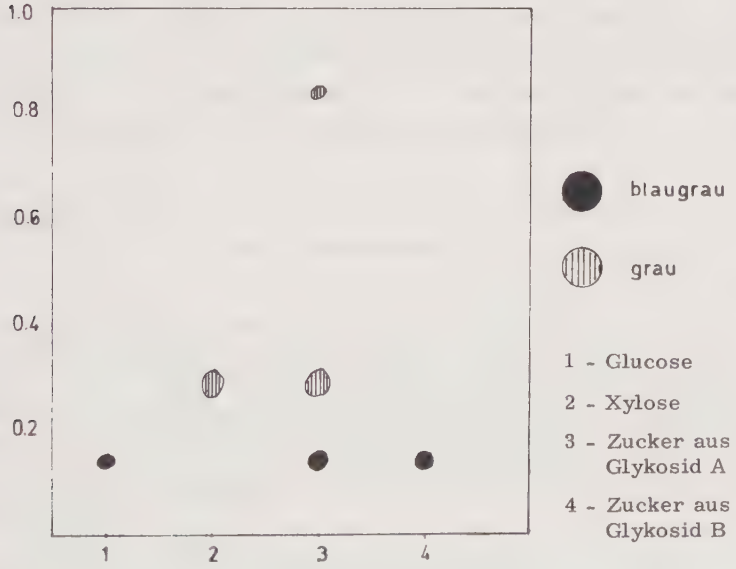


Abb. 27: Papierchromatogramm der Zuckerlösungen
Papier: Schleicher-Schüll 2043 b
Fließmittel: Butanol 2 Aceton 7 Wasser 1
Sprühmittel: Anilinphthalat-Lösung
Sichtbarmachung: 5 - 10 Minuten bei 105° C

54) A.R. Burnett u. R.H. Thomson, J. chem. Soc. (London) 1968, 2437

V. WEITERE AUFTRENNUNG DER ANTHRACHINONFRAKTION

In der Literatur werden bei den Krappwurzel-Anthrachinonen neben den Hydroxyanthrachinonen auch zwei Anthrachinone beschrieben, welche zusätzlich eine Carboxylgruppe enthalten, die Purpuroxanthincarbonsäure und die Purpurincarbonsäure. Es wurde daher versucht, durch Ausschütteln der Aglukon-Ätherlösung eines hydrolysierten Drogenauszuges die Anthrachinone auf Grund ihrer unterschiedlichen Azidität zu trennen. Durch den im Verhältnis zu den anderen Anthrachinonen hohen Gehalt an Alizarin tauchte dieses in den einzelnen Fraktionen als Verunreinigung auf und verhinderte eine einwandfreie Trennung. Es erwies sich hierbei als günstiger, den alkoholischen Drogenauszug zu hydrolysieren, als die Droge nach Hydrolyse mit Äther auszuziehen, was an sich rascher durchführbar ist. Auch durch weitere Abstufung der alkalischen Lösungen ließ sich keine saubere Trennung erzielen.

a) Trennung auf Calciumcarbonat- und Hyflo-Supercellsäulen

Auf Grund der Arbeiten von Boross und Perenyi[55] wurde eine Trennung an einer Calciumcarbonatsäule durchgeführt. Die Verfasser trennen auf diesem Säulenmaterial Anthrachinonmischungen. Sie teilen die Anthrachinonverbindungen auf Grund ihrer Adsorptionsstärke an Calciumcarbonat in drei Gruppen ein: In die Gruppe mit starker Adsorption gehören die Carbonsäuren. In die Gruppe mit mittlerer Adsorption zählen sie Anthrachinone mit Hydroxy-Gruppen. Zur Trennung der dritten Gruppe (die Verfasser nennen sie die "neutralen" Anthrachinone, weil sie sich nur durch Natriumhydroxid ausschütteln lassen[56]), eignen sich Petroläther- oder Cyclohexan-Benzol-

55) L. Boross u. T. Perényi, Planta med. 14, 234 (1966)
56) L. Boross, Acta Chim. Hung 35, 195 (1963)

Mischungen. Für die beiden ersten Gruppen empfehlen sie Benzol-Aceton-gemische.

Die Trennung auf Calciumcarbonat gelang mit einem Aglukonextrakt nicht. Anfänglich kam es jeweils zu einer guten Auftrennung in einzelne Zonen, die ihrer verschiedenen Farben wegen optisch eine gute Trennung anzeigten. Im Verlauf der Wanderung trennte sich die erste Zone stärker von den übrigen, wobei trotz Vorsichtsmaßnahmen sich in der Säule schräg verlaufende Zonen ausbildeten, welchen bald Luftblasen folgten. Eine Trennung ließ sich dann nicht mehr erzielen, da die Zonen am Ende der Säule beim Austropfen ineinanderflossen. Am größten war immer die Fließgeschwindigkeit des Alizarins, welches dc rein erhalten wurde. Die Säulen waren wie beschrieben durch Stampfen mit dem Adsorbens gefüllt worden. Auch ein Einschlämmen mit dem Fließmittel brachte keine Änderung. Wir versuchten daher analog Boross und Perényi die Entwicklung durch Anlegen eines Unterdruckes zu beschleunigen. Da die Säulen leicht zusammensackten trotz vorherigen Spülens mit dem Fließmittel, wurde dann die Tropfgeschwindigkeit stark reduziert. Das Anlegen des Unterdruckes führte jedoch zum gegenteiligen Effekt; die Blasen traten nur noch leichter auf.

Statt Calciumcarbonat benützten wir daher das gleichermaßen empfohlene Hyflo-Supercell. Auch hier trat leicht eine Zusammenballung des Säulenmaterials auf, welches die Säule verstopfte.

Das Mißlingen der Trennung mit diesen Adsorbenzien ist auf verschiedene Faktoren zurückzuführen. Nach ihren Abbildungen zu schließen, benützten die Verfasser Mischungen höchstens dreier Komponenten. In ihrem Gehalt waren nur geringe Unterschiede. Außerdem waren es Mischungen reiner Produkte, welche auf Grund ihrer bekannten chemischen Zusammensetzung leichter zu trennen waren, da keine Nebeninhaltsstoffe das Adsorbens belasteten.

Versuche auf Aluminiumoxid-, Magnesiumsilikat- und Kieselgelsäulen führten zu keinem Ergebnis, da die Anthrachinone trotz Desaktivieren des Säulenmaterials zu stark adsorbiert wurden oder Farblacke bildeten. Teilweise war die Belastbarkeit der Säule für eine präparative Trennung in kleinem Maßstab zu gering.

b) Trennung auf Polyamidsäulen

Auf Grund von Veröffentlichungen durch W. Raszeja und F. Kaczmarek[57] sowie V.A. Stikhin, A.I. Ban'korski und M.E. Perel'son[58] benützten wir als Säulenfüllung Polyamidpulver. Da die gelieferten Handelsprodukte meistens in der Korngröße differierten, wuschen wir die gefüllten Säulen vor dem Auftragen des Extraktes mehrere Tage mit dem Fließmittel. Die Belastbarkeit der Polyamidsäulen ist relativ groß. Auf diese Weise konnte eine gute Grobtrennung durchgeführt werden, die auch mengenmäßig gute Ergebnisse lieferte. Zur Feintrennung benützten wir die Schichtchromatographie. Speziell zur Reingewinnung des Purpurins bedienten wir uns der Gelfiltration mit Sephadex.

c) Trennung auf Sephadexsäulen

Die Gelfiltration mit Sephadex war zur Reinigung der Anthrachinone sehr gut geeignet, da das üblicherweise verunreinigende Alizarin durch das Sephadex-Gel zurückgehalten wurde. Der gewünschte Stoff lief schnell durch die Säule und durch mehrmaliges Umkristallisieren konnte er rein gewonnen werden. Die Belastbarkeit der Sephadex-Säulen ist aber sehr gering. Es eignete sich daher nur zur Reindarstellung eines vorgetrennten Stoffes.

Eine Trennung auf Sephadex für wäßrige Fließmittel (Sephadex G-25) des in wenig 0,01 n Natronlauge gelösten Drogenextraktes führte zu keinem Ergebnis, da die getrennten Anthrachinone auf der Säule im Licht und beim Austropfen an der Luft sich sofort zersetzten. Auch beim Beschicken der auffangenden Reagenzgläser des Fraktionssammlers mit einer neutralisierenden Menge Salzsäure war die Bildung von Artefakten oder Zersetzungsprodukten zu groß.

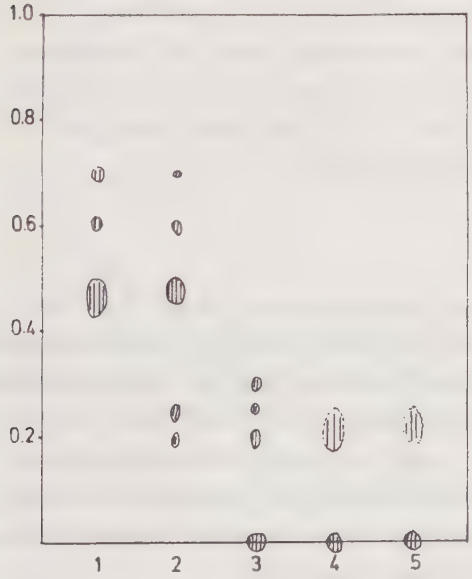
---

57) W. Raszeja u. F. Kaczmarek, Herba polonica 2, 106 (1966)
58) V.A. Stikhin, A.I. Ban'korski, M.E. Perel'son, Khim. Prirodn. Soedin., Akad. Nauk. UDSSR 2 (1), 12 (1967)
ref. C. 1967 - 37, 129, 1121 (1967)

d) Vortrennung durch fraktioniertes Ausziehen der Droge

Günstig zu einer Vortrennung der Inhaltsstoffe erwies sich ein fraktioniertes Ausziehen der Droge im Soxhlet. Die Krappwurzel wurde nacheinander mit Benzol, Chloroform, Aceton, Äthanol und Methanol ausgezogen. Eine nachfolgende Extraktion mit 50%igem Methanol ergab keine Anthrachinone mehr.

Dieses Verfahren trennte in der Benzolfraktion fast nur die Hauptmenge des Alizarins ab (Abb. 28). Die nachfolgende Chloroformfraktion enthielt dadurch ein günstigeres Verhältnis der Aglukoninhaltsstoffe, so daß eine Trennung auf DC möglich wurde. Manche auf der Platte getrennten Anthrachinone wurden jedoch so stark adsorbiert, daß nur geringe Mengen wieder aus dem Adsorbens herausgelöst werden konnten. Die Acetonfraktion enthielt neben Aglukonen mit Rf 0,2 - 0,4 auch geringe Mengen Glykoside, welche besonders in den Äthanol- und Methanolfraktionen enthalten waren. Die einzelnen Fraktionen gaben jedoch keine Hinweise auf Gehalt in der Droge, da die Stoffe aus mehreren Fraktionen meist nicht gleich gut abzutrennen waren.



1 - Benzolfraktion
2 - Chloroformfraktion
3 - Acetonfraktion
4 - Äthanolfraktion
5 - Methanolfraktion

Kieselgel G Platte
Fließmittel: Benzol 75
Ameisensäureäthylester 24
Ameisensäure 1
Besprüht mit methanolischer Kalilauge
Es sind nur Anthrachinonflecke eingezeichnet.

Abb. 28: Dünnschichtchromatogramm eines fraktionierten Ausziehens der Droge im Soxhlet

e) Isolierte Anthrachinonaglukone

1) Alizarin

Ein Ätherauszug der hydrolysierten Droge wurde mit Benzol auf eine Polyamidsäule geschlämmt und mit Benzol entwickelt. Als zweite Fraktion konnte ein Gemisch von Purpurin und Alizarin aufgefangen werden, welches mit zunehmender Fraktionierung immer ärmer an Purpurin wurde und nach einigen Fraktionen reines Alizarin darstellte. Die Substanz war dünnschichtchromatographisch rein; sie hatte denselben Rf-Wert wie authentisches Alizarin. Durch Sublimation im Vakuum wurde sie von etwa gelöstem Polyamid befreit. Durch Schmelzpunkt und Spektren wurde die Identität festgestellt.

2) Purpurin

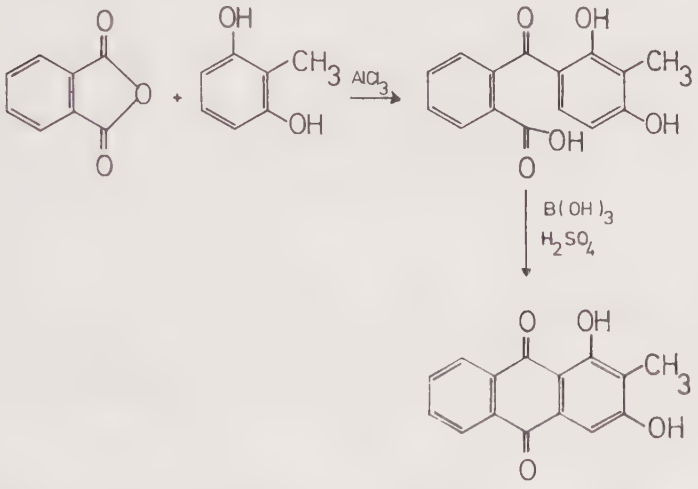
Aus der Alizarin-Purpurin-Fraktion, welche aus einer Polyamidsäule gewonnen wurde, konnte mit präparativer Dünnschichtchromatographie der zweite Anthrachinonbestandteil isoliert werden. Da die Rf-Werte dieser beiden Stoffe sehr nahe beieinander lagen, war es jedoch schwierig, Purpurin allein durch Dünnschichtchromatographie völlig rein zu gewinnen. Wir bedienten uns daher der Gelfiltration mit Sephadex LH 20. Mit Chloroform auf eine Säule aufgetragen, konnte aus dem Gemisch reines Purpurin zuerst aufgefangen werden. Die Identität wurde spektralanalytisch, durch Elementaranalyse und den Schmelzpunkt gesichert.

3) Rubiadin

Auf eine Polyamidsäule wurde ein Glykosidauszug der Droge (nach vorherigem Abtrennen der Aglukone durch Ausziehen im Soxhlet mit Äther) aufgetragen. Beim Entwickeln mit Äthanol konnte ein Glykosid gewonnen werden, welches nach der Hydrolyse Rubiadin ergab. Die Identität konnte durch Vergleich mit einem synthetischen Produkt, sowie durch Spektralanalyse gesichert werden. Die Substanz war hellgelb und löste sich in Schwefelsäure mit gelber, in Alkali mit roter Farbe. Der Schmelzpunkt betrug 278° (nach mehrmaligem Umkristallisieren; Rohprodukt 245°).

Das synthetische Produkt gewannen wir durch Umsetzung von Phthalsäureanhydrid mit 2,6-Dihydroxytoluol. Wir versuchten es zuerst analog der Darstellung von Chinizarin (aus Phthalsäureanhydrid und Hydrochinon) durch Erhitzen auf 160° unter Einwirkung von Schwefelsäure und Borsäure. Dieser Versuch führte jedoch auch bei Änderung der Bedingungen zu Gemischen.

Lösen der beiden Ausgangsstoffe in Tetrachloräthan und Umsetzung mit Aluminiumchlorid führte über eine Zwischenstufe, die nach mehrmaligem Umkristallisieren rein gewonnen werden konnte, bei Einwirkung von Schwefelsäure und Borsäure auf dem Wasserbad zu Rubiadin.



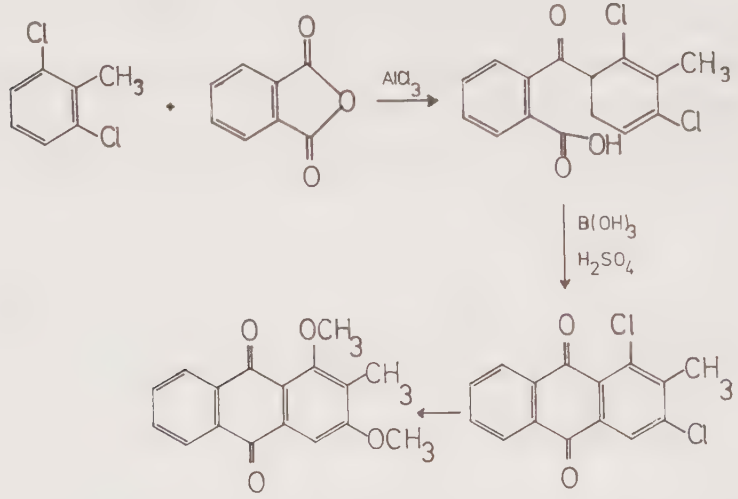
In der Literatur sind neben den Synthesen von Stouder und Adams[59] sowie Mitter und Gupta[30] besonders die beiden Darstellungsmöglichkeiten von Jones und Robertson[37] erwähnenswert, welche auf diesem Weg die Struktur des Rubiadins aufklärten.

1. Synthese: Ausgehend von Dichlortoluol und Phthalsäureanhydrid, verknüpft mit einer Friedel-Crafts-Reaktion zu einer substituierten Benzo-

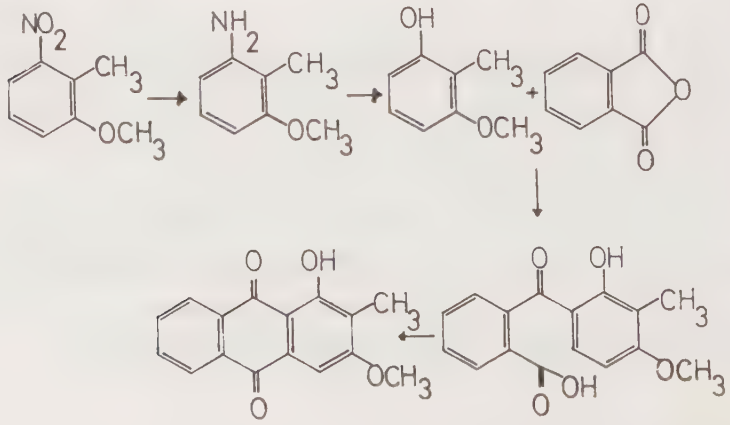
---

59) Stouder und Adams, J. Amer. chem. Soc. 49, 2043 (1927)

phenoncarbonsäure, erhält man unter Einwirkung von Schwefelsäure und Borsäure eine Ringverknüpfung. Nach Austausch der beiden Chlorsubstituenten gegen Methoxygruppen, was nur mit sehr schlechter Ausbeute gelingt, kommt man nach Entmethylierung zu Rubiadin.



Die 2. Synthese geht von 2-Nitro-6-methoxytoluol aus, welches über Reduktion zur Aminogruppe, Diazotierung und Verkochen zum 6-Methoxycresol umgewandelt wird. Nach Umsetzung mit Phthalsäureanhydrid und Ringschluß wird ein 3-0-Methylrubiadin erhalten.



4) Purpuroxanthin

Die Droge wurde im Soxhlet einer Vortrennung durch fraktioniertes Ausziehen unterworfen. Nach Abtrennung der Benzolfraktion wurde mit Chloroform extrahiert. Auf präparativen Kieselgel G Platten wurde der Chloroformauszug getrennt. Eine gelbe Zone mit Rf 0,7, welche eine rotbraune Bornträger-Reaktion zeigte, wurde abgekratzt und extrahiert. Bei der Extraktion traten große Verluste auf, die auch durch langdauernde Extraktion nicht vermieden werden konnten. Zur Abtrennung mitgelösten Kieselgels wurde mehrere Male umkristallisiert. Durch Schmelzpunkt (Schmp. 258°, Lit. 263 - 270°), Spektren und Elementaranalyse konnte die Identität gesichert werden.

VI. DARSTELLUNG DER GLYKOSIDE

Im Soxhlet wurden durch fraktionierte Extraktion mit Äther die Aglukone der Droge entzogen. Durch Ausziehen mit Äthanol und Methanol wurde ein reiner Glykosidextrakt gewonnen. Auf einer Polyamidsäule wurde dieser Glykosidextrakt mit Äthanol getrennt. Die beiden Glykoside, welche aus der Säule aufgefangen werden konnten, waren nur in wenigen Fraktionen dc rein, teils konnten sie nur als Gemisch aufgefangen werden. Die Gemischfraktionen wurden daher vereinigt und eingeengt. Das Konzentrat wurde auf eine Sephadex G-25 Säule aufgetragen und mit Äthanol, später Methanol entwickelt. Auf diese Weise konnten die Mischfraktionen dc rein gewonnen werden. Da für Glykoside keine Vergleichssubstanzen zur Verfügung standen, wurden Schmelzpunkte und Rf-Werte bestimmt und die Glykoside dann hydrolysiert.

Glykosid A Schmp. 256° Rf 0,43

Glykosid B Schmp. 261° Rf 0,24

(Rf-Werte auf Polyamid; Fließmittel = Äthylacetat/Methanol/Wasser = 100/17/13).

Als Aglukon des Glykosids A konnte Alizarin identifiziert werden. Die Zucker waren Xylose und Glucose - Primverose, wie durch DC und PC bestimmt wurde.

Als Aglukon des Glykosids B konnte Rubiadin ermittelt werden. Es war mit Glucose verknüpft.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Bornträger-Reaktion ist bisher eingehend nur am Beispiel des 1,8-Dihydroxyanthrachinons untersucht worden. Wir prüften nun das Auftreten der Färbung, ihre Stabilität und den Einfluß von Alkaliart und -menge bei Hydroxyanthrachinonen, die aus der Krappwurzel gewonnen werden und die durch eine unsymmetrische Anordnung ihrer Hydroxylgruppen charakterisiert sind; zum Vergleich wurden einige andere, ähnlich gebaute Anthrachinone untersucht.

Bei den untersuchten unsymmetrischen Hydroxyanthrachinonen bildet sich die maximale Rotfärbung der Bornträger-Reaktion bereits in 5 Minuten aus, beim 1,8-Dihydroxyanthrachinon ist dies erst nach 30 Minuten der Fall.

Ammoniak genügt auch bei Zugabe von 10 Äquivalenten bei den untersuchten Hydroxyanthrachinonen nicht, um die volle Färbung zu erzielen. Ausnahmen stellen 1,2,4-Trihydroxyanthrachinon und 1,2,5,8-Tetrahydroxyanthrachinon dar. - In wasserfreiem Milieu führen 7 Äquivalente Natriummethylat zur Ionisierung des 1,8-Dihydroxyanthrachinons. Bei den hier untersuchten Anthrachinonen tritt dieser Effekt schon mit 2 - 4 Äquivalenten auf, 1,2,4-Trihydroxyanthrachinon zeigt bereits mit 1 Äquivalent die Maxima der ionisierten Verbindung.

Die Bornträger-Reaktion ist beim 1,2-Dihydroxyanthrachinon stabiler als beim 1,8-Dihydroxyanthrachinon. Die Extinktion fällt in 6 Stunden bei 1,2-Dihydroxyanthrachinon um 2%, bei 1,8-Dihydroxyanthrachinon um 20%. Die anderen untersuchten Hydroxyanthrachinone sind labiler. Auch bei Aufbewahrung im Dunkeln fällt die Extinktion im Maximum der Bornträger-Lösung innerhalb von 6 Stunden bei 1,4-Dihydroxyanthrachinon um 20%, bei 1,2,5,8-Tetrahydroxyanthrachinon um 65% und bei 1,2,4-Trihydroxyanthrachinon sogar um 85% der ursprünglichen Höhe ab. Bei normaler Laborbeleuchtung ist der Farbverlust noch größer:
6 Stunden nach dem Alkalisieren fällt die Extinktion der Bornträger-Lösung bei 1,4-Dihydroxyanthrachinon um 25% und bei 1,2,5,8-Tetrahydroxy-

anthrachinon um 80% des anfänglichen Wertes ab, bei 1,2,4-Trihydroxyanthrachinon sogar um 94%.

Eine Gehaltsbestimmung für die Krappwurzel wurde ausgearbeitet. Da Purpurin als wichtiger Bestandteil der Droge nicht vernachlässigt werden darf, aber eine sehr labile Bornträger-Färbung gibt, kam nur eine spektrophotometrische Bestimmung im UV-Bereich ohne Laugenzusatz in Betracht. Wie Messungen bei den Wellenlängen 237 und 248 nm zeigten, kann so der Gehalt an Alizarin und Purpurin bestimmt werden. Durch quantitative Dünnschichtchromatographie wurden die erhaltenen Werte zur Ausarbeitung der Methode kontrolliert.

Der Gehalt von handelsüblichen Drogenmustern wurde bestimmt. Die getrocknete Krappwurzel enthält durchschnittlich 0,25% freies Aglukon (Alizarin 0,1%; Purpurin 0,15%) und 2,65% Glykoside (Alizarinprimverosid 2,2%; Purpuringlucosid 0,45%).

Verschiedene Adsorbenzien wurden in Säulen auf ihre Verwendbarkeit zur Trennung von Aglukon- oder Glykosidextrakten geprüft. Calciumcarbonat, Hyflo-Supercel, Kieselgel, Aluminiumoxid und Magnesiumsilikat erwiesen sich als nur wenig geeignet. Polyamid und Sephadex eigneten sich dagegen gut. Die geringe Belastbarkeit war aber bei beiden Adsorbenzien störend. Günstig war darum eine grobe Vortrennung der Anthrachinone durch fraktionierte Extraktion im Soxhlet mit lipophilen und hydrophilen Lösungsmitteln und anschließende Trennung der Fraktionen auf präparativen Dünnschichtplatten oder Säulen. Auf diese Weise wurden die Anthrachinone Alizarin, Purpurin und Purpuroxanthin und die Anthrachinonglykoside Alizarinprimverosid und Rubiadinglucosid aus der Krappwurzel rein isoliert und chromatographisch, spektrophotometrisch und elementaranalytisch charakterisiert. Als Zucker wurden Primverose (6-β-D-Xylosido-D-glucose), Xylose und Glucose erhalten und durch Papier- und Dünnschichtchromatographie identifiziert.

EXPERIMENTELLER TEIL

Schmelzpunkte:

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Kofler-Heiztisch-Mikroskop durchgeführt und sind nicht korrigiert.

Ultraviolett-Absorptionsspektren

Die UV-Spektren wurden qualitativ in einem Beckman-Spektralphotometer DB und quantitativ in einem Zeiss-M4-QII-Gerät bestimmt Die Messung erfolgte in Küvetten einer Schichtdicke von 1 cm. Als Lösungsmittel wurde Methanol "für die Chromatographie" (Merck) benutzt.

Infrarotspektren

Die Messung erfolgte in einem Beckman-Spektralphotometer IR-8. Es wurden Kaliumbromidpresslinge benutzt.

Kernresonanzspektren

Die Kernresonanzspektrenaufnahme erfolgte in einem Varian A60-Spektrometer. Als Lösungsmittel wurde deuteriertes Dimethylsulfoxid benutzt. Die Lage der Signale wird in τ-Einheiten angegeben (Bezugssignal Tetramethylsilan = 10 τ).

Dünnschichtchromatographie

Für die präparative und analytische Dünnschichtchromatographie wurde Kieselgel G, Kieselgur G und Polyamidpulver (alle Präparate Merck) benutzt.

Elementaranalysen

Die Elementaranalysen wurden im Laboratorium des Pharmazeutisch-chemischen Institutes Tübingen mit der Mikroschnellverbrennungsapparatur "Mikro R", Heraeus, durchgeführt.

Papierchromatographie

Wir entwickelten absteigend auf Schleicher und Schüll Papier 2043b. Als Fließmittel benutzten wir eine Mischung aus n-Butanol/Aceton/Wasser = 2/7/1. Zur Sichtbarmachung der Zucker besprühten wir sie mit TTC-Lösung und Anilinphthalat-Lösung.

Herstellung von TTC-Lösung

1 Teil einer 4%igen Lösung von 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid in Methanol wird mit 1 Teil methanolischer 1n Natronlauge versetzt. Die Lösung ist frisch herzustellen. Nach Trocknen bei 110° C (5 - 10 Minuten) sind die Flecke sichtbar.

Herstellung von Anilinphthalat-Lösung

0,93 g reines Anilin und 1,66 g o-Phthalsäure werden in 100 ml wassergesättigtem Butanol gelöst. Nach Besprühen werden die Zucker durch Trocknen (10 min bei 105° C) sichtbar. Xylose, Rhamnose, Ribose - rot; Glucose, Arabinose, Laevulose, Sorbose - braun.

Droge

Die für unsere Versuche verwendete Droge Rubia tinctorum stammte von der "Pharmazeutischen Fabrik am Birkenweg"+).

+) Herrn Dr. R. Lipfert von der Fa. Pharmazeut. Fabrik am Birkenweg, Frankfurt a.M., sei für das Drogenmaterial herzlich gedankt.

Messung der Extinktionsabnahme bei Zusatz von Laugengemisch DAB 7 innerhalb von 6 Stunden

Je 1,0 mg 1,2-Dihydroxyanthrachinon, 1,4-Dihydroxyanthrachinon, 1,2,4-Trihydroxyanthrachinon und 1,2,5,8-Tetrahydroxyanthrachinon wurden in 50 ml Methanol p.a. gelöst. Nach Zugabe von 50 ml Laugengemisch DAB 7 wurde gemessen.

a) Aufbewahrung im Dunkeln

b) Aufbewahrung bei normaler Laborbeleuchtung

c) Bestrahlung mit Fluotest forte, Distanz 25 cm

Messung: 0; 5; 10; 15; 20; ... 1h; 2h; 3h; 4h; 5h; 6h.

Absorptionskurven bei Zusatz von 10 Äquivalenten Lauge

Einwaage: jeweils 1 mg/100 ml Meßlösung

Lauge: 10 Äquivalente a) Natronlauge

b) Ammoniak

Meßbereich: 500 - 620 nm

Messung: 5 - 20 min nach Laugenzugabe

Zusatz verschiedener Äquivalente Natriummethylat zur gleichen Menge Anthrachinon

Einwaage: jeweils 1 mg/100 ml Meßlösung

Lauge: 1 - 10 Äquivalente Natriummethylat

(Alizarin 1 mg = 41,6 ml 0,001 n $NaOCH_3$)

Meßbereich: 500 - 620 nm

Messung: 5 - 20 min nach Laugenzugabe

Bereitung der präparativen Dünnschichtplatten

88 g Kieselgel G Merck wurden durch kräftiges Umschütteln mit 170 ml Wasser zu einer homogenen Suspension. Die letzten 2 Minuten (es dauerte üblicherweise 6 - 7 Minuten) wurde nur noch vorsichtig geschüttelt, um den Einschluß von Luftblasen zu vermeiden. Mit dem Desaga-Streichgerät für präparative Platten wurde die Suspension gleichmäßig auf 2 Platten

(20 x 40 cm) gestrichen. Nach mehrstündigem Trocknen an der Luft wurden die Platten 3h lang bei 110° C im Trockenschrank aktiviert.

Herstellen der Polyamidplatten.

6 g Polyamidpulver Merck und 30 ml Methanol wurden in einem Jodzahlkolben eine halbe Stunde lang kräftig geschüttelt. Die letzten Minuten darf der Kolben nur noch vorsichtig geschwenkt werden. Mit dem Desaga-Gerät werden 4 Platten 20 x 20 cm bestrichen. Das Streichgerät muß sehr schnell über die Platten gezogen werden. Nach einer halben Stunde Trocknen an der Luft werden die Platten bei 50° C eine Stunde lang aktiviert.

Berechnung der Extinktionsfraktoren

Es gilt die Gleichung:

$$E = \varepsilon \cdot c \quad \text{(in molarer Konzentration)}$$

Hat eine reine Alizarinlösung (= A) bei 248 nm die Extinktion E = 0,691, während die Konzentration c = 0,000027 beträgt, so ergibt sich folgende Gleichung:

$$0,691 = \varepsilon_{A248} \cdot 0,000027$$

Die Auflösung ergibt

$$\varepsilon_{A248} = 25\,500$$

Entsprechend ergibt die Bestimmung des Extinktionsfaktors für Purpurin (= P) bei 237 nm bei einem Extinktionswert von 0,386 und einer Konzentration von c = 0,000023 den Wert 17 300.

Bei der Bestimmung eines Gemisches dieser beiden Anthrachinonderivate ergeben sich folgende Gleichungen:

(1) $E_{237} = \varepsilon_{A237} \cdot c_A + \varepsilon_{P237} \cdot c_P$

(2) $E_{248} = \varepsilon_{A248} \cdot c_A + \varepsilon_{P248} \cdot c_P$

Einsetzen der gemessenen Extinktionswerte $E_{237} = 0,434$ und $E_{248} = 0,498$, der molaren Konzentrationen $c_A = 0,0000102$ und $c_P = 0,0000134$ sowie der oben ermittelten Extinktionsfaktoren ergibt folgende Gleichung:

(1) $0,434 = \varepsilon_{A237} \cdot 0,0000102 + 17\,300 \cdot 0,0000134$

(2) $0,498 = 25\,500 \cdot 0,0000102 + \varepsilon_{P248} \cdot 0,0000134$

Die Ausrechnung ergibt folgende Werte

$$\varepsilon_{A237} = 18\,900$$

$$\varepsilon_{P248} = 17\,150$$

Berechnung der Konzentration einer Mischung von Alizarin und Purpurin

Einsetzen von c_A aus Gleichung (1) in Gleichung (2) ergibt

$$E_{248} = \varepsilon_{A248} \cdot \frac{(E_{237} - \varepsilon_{P237} \cdot c_P)}{\varepsilon_{A237}} + \varepsilon_{P248} \cdot c_P$$

Beispiel:
Die Aglukonbestimmung wurde mit 2,5349 g Droge durchgeführt. Der Ätherextrakt der Droge wurde zur Trockne eingeengt, der Rückstand in 100 ml Methanol aufgenommen und die Methanollösung 1 : 10 verdünnt. Die Extinktionswerte betrugen $E_{237} = 0,274$ und $E_{248} = 0,319$
Die Ausrechnung ergab einen Gehalt von 0,13% Purpurin. Einsetzen von c_P aus Gleichung (2) in (1) ergab

$$E_{237} = \varepsilon_{A237} \cdot c_A + \varepsilon_{P237} \cdot \frac{(E_{248} - \varepsilon_{A248} \cdot c_A)}{\varepsilon_{P248}}$$

Der Gehalt an Alizarin betrug 0,08%.

Die Glykosidbestimmung wurde anschließend an die Ätherextraktion durchgeführt. Die Droge wurde im Soxhlet mit Methanol extrahiert. Die Methanollösung wurde auf 100 ml eingeengt. 20 ml der Methanollösung wurden eine Stunde lang mit 40 ml 2n HCl gekocht. Die hydrolysierten Anthrachinone wurden mit Äther ausgeschüttelt. Nach Abziehen des Äthers wurde der Rückstand in 100 ml Methanol aufgenommen. Zur Messung wurde die Lösung noch 1 : 10 verdünnt. Die Extinktionswerte betrugen

$$E_{237} = 0,492 \text{ und } E_{248} = 0,628$$

Die Ausrechnung ergab einen Gehalt von 1,08% Alizarin und 0,29% Purpurin (bezogen auf freies Anthrachinon) bzw. 2,18% Alizarinprimverosid und 0,45% Purpuringlucosid.

Kontrolle der Extinktionsfaktoren

Zur Kontrolle wurden die Faktoren in die Gleichungen, aus denen sie ermittelt wurden, eingesetzt und so rechnerisch die Extinktion ermittelt und mit dem am Gerät abgelesenen Wert verglichen

Alizarin + Purpurin in ml A = 0,651 mg/100 ml P = 0,572 mg/100 ml	E_{237}		E_{248}	
	abgelesen	berechnet	abgelesen	berechnet
6 + 4	0,46	0,46	0,62	0,57
2 + 4	0,43	0,43	0,52	0,49
6 + 10	0,43	0,43	0,50	0,50
10 + 10	0,45	0,45	0,56	0,54
20 + 25	0,44	0,44	0,52	0,52
2 + 10	0,42	0,41	0,45	0,44

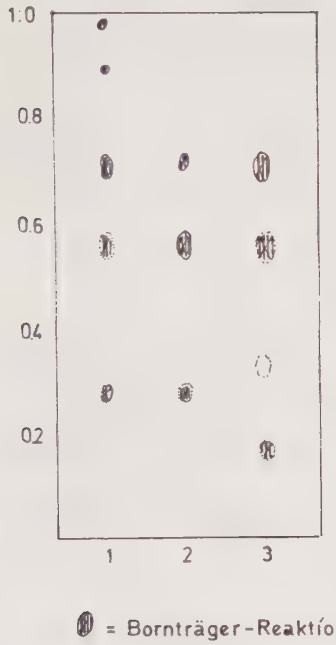
Gehaltsbestimmung der Droge

2,00 g Droge wurden im Soxhlet nacheinander mit Äther und Methanol extrahiert. Die Ätherlösung wurde zur Trockne eingeengt, der Rückstand in Methanol p.a. aufgenommen. Die Glykosidlösung wurde mit 10 ml 10%iger Salzsäure hydrolysiert, mit Äther ausgeschüttelt, der Äther zur Trockne eingeengt und der Rückstand in Methanol p.a. aufgenommen. Beide Aglukonlösungen wurden mit Methanol p.a. 1 : 10 verdünnt und im Zeiss-Spektrophotometer in 1 cm Küvetten gemessen.

Ausschüttelung der Inhaltsstoffe

11,3 g gepulverte (Sieb IV) Droge wurde mit 200 ml 10%iger Salzsäure am Rückflußkühler hydrolysiert. Die filtrierte Lösung wurde mit 100 ml Äther, dann 2 x mit je 50 ml ausgeschüttelt. Der Rückstand wurde mit 350 ml Äther im Soxhlet extrahiert. Die vereinigten neutralen Ätherlösungen wurden am Rotationsverdampfer auf 100 ml eingeengt. Die eingeengte Ätherlösung

wurde nacheinander dreimal mit je 100 ml 0,2%iger $NaHCO_3$-Lösung ausgeschüttelt, danach dreimal mit derselben Menge 0,2%iger Na_2CO_3-Lösung und zuletzt dreimal mit je 100 ml 0,2%iger Natronlauge. Die alkalischen Lösungen wurden nach Ansäuern jeweils mit 300 ml Äther ausgeschüttelt.



1 - Natriumhydrogencarbonat-Ausschüttelung

2 - Natriumcarbonat-Ausschüttelung

3 - Natriumhydroxid-Ausschüttelung

Kieselgel G Platte
Fließmittel: Benzol 60
Tetrachlorkohlenstoff 15
Eisessig 30

Besprüht mit methanolischer Kalilauge

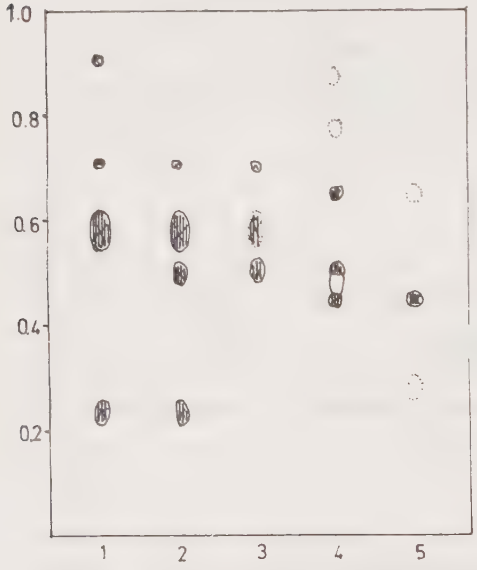
Abb. 29: Dünnschichtchromatogramm der ausgeschüttelten Lösungen

Ausschüttelung der Inhaltsstoffe

Einwaage 14,2 g Droge. Fünfmal ausgeschüttelt mit je 100 ml 0,1%igen Lösungen (Natriumhydrogencarbonat, Natriumcarbonat und Natriumhydroxid). Sonst wie oben beschrieben.

Trennung auf Calciumcarbonatsäule

80,2 g Droge, hydrolysiert mit 900 ml 18%iger Salzsäure am Rückfluß, wurden mit Äther ausgeschüttelt bzw. extrahiert. Der Trockenextrakt (ca. 2 g) wurde auf eine Calciumcarbonatsäule (300 g Calciumcarbonat; Säule: 1,3 m lang, 50 mm Durchmesser) aufgetragen. Calciumcarbonat war trocken in die Säule eingefüllt worden. Mit Unterdruck (43 mm Hg) und unter Klopfen an die Säulenwand war die Säule gleichmäßig gestopft worden. Vierundzwanzig Stunden lang war die Säulenfüllung mit dem Fließmittel (Benzol: Cyclohexan = 1 :4) gewaschen worden. Nach Auftragen des Drogenextraktes wurde die Tropfenzahl so eingestellt, daß sich die erste farbige Zone in der Säule pro Minute etwa 3 mm voranbewegte.



1 - 1. Fraktion
2 - 2. Fraktion etc.

Kieselgel G Platte
Fließmittel: Benzol 50
Tetrachlorkohlenstoff 20
Eisessig 30

Besprüht mit methanolischer Kalilauge

Abb. 30: Dünnschichtchromatogramm der ersten fünf Fraktionen

Nach der sechsten Fraktion war die Vermischung durch schräge Zonenbildung so groß, daß die Fraktionen mehr dem aufgetragenen Extrakt ähnelten.

Trennung auf Hyflo-Supercellsäule

Eine Säule (40 mm dick, 120 cm lang) wurde mit ca. 200 g Hyflo-Supercell durch Einschlämmen mit dem Fließmittel gefüllt (Fließmittel Benzol-Cyclohexan = 1 : 4). Nach dem Auftragen wurde das Fließmittel geändert (F: Benzol-Aceton = 19 - 1). Die ersten fünf Fraktionen konnten aufgefangen werden. Danach war die Säule fast ganz verstopft. Die Tropfenzahl betrug weniger als 5 Tropfen pro Minute.

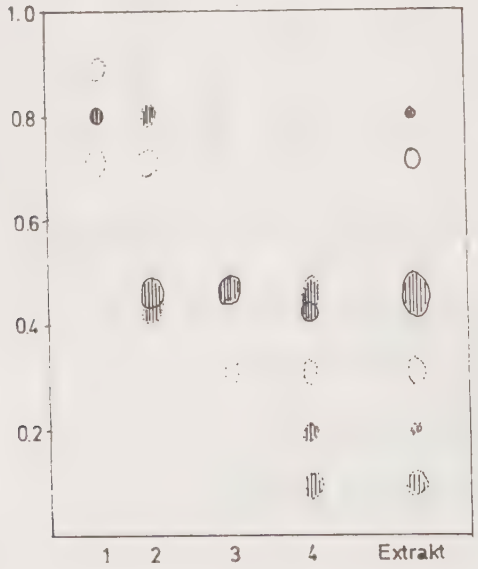
Abb. 31: Dünnschichtchromatogramm der ersten fünf Fraktionen der Hyflo-Supercellsäule
(Farbkennzeichnung vgl. Abb. 24)

Kieselgel G Platte
Fließmittel: Benzol 40
Tetrachlorkohlenstoff 20
Eisessig 15
Sprühmittel: methanolische Kalilauge

Trennung auf Polyamidsäule

57,5 g Droge wurden mit Chloroform erschöpfend extrahiert. Der Trockenrückstand (ca. 0,8 g) wurde auf eine Polyamidsäule (2 m lang, 20 mm dick) aufgetragen. Das Säulenmaterial war zuvor 24 Stunden lang mit alkoholfreiem Chloroform gewaschen worden. Es trat keine bessere Trennung als bei dem vorherigen Säulenmaterial ein.

Aus diesem Grund wurde ein neuer Versuch mit anderem Fließmittel unternommen. Die Droge (87,4 g), hydrolysiert mit 10%iger Salzsäure, ergab nach Extraktion mit Äther 3,1 g Trockenextrakt. Ein Gramm dieses Extraktes wurde auf eine Polyamidsäule (20 mm dick, 2 m lang), welche wie oben beschrieben mit dem Fließmittel vorbehandelt war, aufgetragen. Als Fließmittel wählten wir trocknes Benzol. Beim Entwickeln konnten einige Fraktionen fast völlig rein erzielt werden. Die Ausbeute war jedoch zu gering (Ausbeute: Fraktion 1 = 50 mg Rohprodukt; Fraktion 2 = 400 mg eines Gemisches; Fraktion 3 = 70 mg fast rein; Fraktion 4 = 80 mg unrein).



Kieselgel G Platte
Fließmittel: Benzol 75
Ameisensäureäthylester 24
Ameisensäure 1

Besprüht mit methanolischer Kalilauge

Abb. 32: Dünnschichtchromatogramm der 4 Fraktionen der Polyamidsäule

Die erste Fraktion besaß keinen Schmelzpunkt unter 350° C. Die zweite Fraktion war nach Trennung auf einer kleinen Säule als Alizarin (Schmp. 285 Lit. 290) und Purpurin, welches jedoch nicht völlig rein erhalten werden konnte (Schmp. 240° C, Lit. 253 - 259° C), zu identifizieren. Der Schmelzpunkt der dritten Fraktion war 205 - 210° C. Der Schmelzpunkt der vierten Fraktion betrug 270° C. Die beiden letzten Fraktionen waren aus der Polyamidsäule mit alkoholfreiem bzw. -haltigem Chloroform eluiert worden. Die übrigen Bestandteile der Droge konnten nur mit Dimethylformamid aus der Säule eluiert werden.

Polyamidgroßversuch

Auf eine Polyamidsäule, vorbehandelt wie auf S. 64 beschrieben, wurden 12,97 g Aglukonextrakt (mit Äther extrahiert) aufgetragen. Säule: (2 m lang, 50 mm dick). Die austropfenden Fraktionen wurden mit dem Fraktionssammler in 30 ml Reagensgläsern ausgefangen.

Fraktion	1 - 25	verharzender Stoff
	26 - 81	kein Anthrachinon
	81 - 180	Anthrachinon
	180 - 570	Alizarin + Purpurin
	570 - 730	Alizarin

Die übrigen Anthrachinonbestandteile der Droge ließen sich mit nichtagressiven Fließmitteln nicht aus der Säule holen. Da die Elution ohne Unterbrechung zwei Monate dauerte, waren die übrigen Bestandteile vielleicht zu stark adsorbiert.

Gewinnung natürlichen reinen Alizarins

1 g der Fraktion 570 - 730 der Polyamidsäule (vgl. oben) wurden sublimiert im Mikrosublimator bei 10 mm Hg und 190° C. Der Schmelzpunkt der erhaltenen Substanz (0,85) betrug 286° C; die Verbrennung ergab:

C = 70,3%; Ber. 70,0%

H = 3,4%; Ber. 3,36%

Trennung des Purpurins

2 g der Fraktion 180 - 570 der Polyamidsäule (vgl. S. 65) wurde in Äther gelöst und auf 15 präparative Dünnschichtplatten aufgetragen. Entwickelt wurde mit dem Fließmittel Benzol-Ameisensäureäthylester-Ameisensäure = 75 - 24 - 1. Die Purpurinzonen wurden am Rande der Platte durch Besprühen sichtbar gemacht und mit dem Spatel abgekratzt. Im Soxhlet wurde mit Äther eluiert. Nach mehrmaligem Umkristallisieren, um mitgelöstes Kieselgel abzutrennen, wurde die Substanz im Vakuum (10 mm Hg) bei 155° C im Mikrosublimator sublimiert. Ausbeute: 300 mg, die Substanz war nicht völlig rein, wie eine Verbrennung und der Schmelzpunkt zeigten (C 65, 95%; Ber.: 65, 63%; H 5, 84%; Ber.: 3, 16%). Nach mehrmaligem Umkristallisieren ließ sich der Schmelzpunkt auf 257° C (vorher 248° C) und die Verbrennungswerte auf C 65, 43% und H 3, 16% verbessern.

Gewinnung synthetischen Purpurins

10 g Alizarin und 10 g Mangandioxid wurden mit 100 ml Schwefelsäure (conc) solange auf 150 - 170° C erhitzt, bis die Chromatographie ein reines Produkt zeigte.
Rohprodukt 5, 17 g (48, 5% der Theorie).

3 g Alizarin in 24 g konz. Schwefelsäure wurden mit einer Suspension von 1, 85 g Mangandioxid in 8 g konz. Schwefelsäure unter Umrühren versetzt. Nach 1, 5h wurde das Reaktionsgemisch in Wasser gegossen.
Rohprodukt 1, 38 (43% der Theorie)

Das zweite Verfahren ist vorzuziehen, da ein reineres Produkt erhalten wird. Zur völligen Reinigung ließen wir das Rohprodukt über eine Sephadex LH 20 Säule laufen.

Darstellung des Rubiadins

1. Darstellung analog Chinizarinsynthese (Organicum S. 291):
10, 2 g Phthalsäureanhydrid, 2, 88 g Dihydroxytoluol und 0, 85 g Borsäure wurden mit 10 ml H_2SO_4 conc. 45 min auf 160° C erhitzt, dann 25 min auf 200° C. Nach dem Abkühlen wurde das Reaktionsgemisch in Wasser gegos-

sen. Nach kräftigem Auswaschen mit Wasser wurden 5,3 g Rohprodukt erhalten, welches drei weitere Stoffe enthielt.

2. Darstellung:

0,6 g Phthalsäureanhydrid und 0,6 g Dihydroxytoluol wurden in 50 ml Tetrachloräthan (1,1,2,2) unter Umrühren mit 1,2 g Aluminiumoxid versetzt. Drei Stunden lang wurde auf 125° C erhitzt. Nach Abkühlen wurden 50 ml 10%ige Salzsäure zugesetzt und nicht umgesetztes Tetrachloräthan und Phenol durch Wasserdampfdestillation entfernt. Der Rückstand wurde in 25 ml 5% $NaHCO_3$-Lösung gelöst, filtriert und das Filtrat mit 10%iger Salzsäure angesäuert. Aus Benzol und Essigsäure wurde umkristallisiert. Rohausbeute 0,3 g (25% der Theorie) Schmp. 225° C (Lit 223°)

C: Gef.: 65,13 + 65,09; Ber.: 66,17 H: Gef.: 4,60 + 4,51; Ber.: 4,44

Die 0,3 g Rohausbeute wurden mit 0,6 g Borsäure in 4 ml konz. Schwefelsäure gelöst und 25 min im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen wurde auf Eis gegossen und aus Benzol umkristallisiert. Das erhaltene Produkt zersetzte sich beim Umkristallisieren teilweise.

Gewinnung des Purpuroxanthin

375 g Droge wurden mit Benzol im Soxhlet mehrere Tage extrahiert. Danach wurde die noch benzolfeuchte Droge mit Chloroform eluiert. Der Chloroformextrakt wurde im Rotationsverdampfer schonend zur Trockne eingeengt (trocken 6,1 g). Vier Gramm dieses Extraktes wurden auf 30 präparativen Dünnschichtplatten chromatographiert. Die gelbe Zone mit Rf 0,7 wurde vorsichtig abgeschabt und im Soxhlet mit Äther extrahiert. Es wurden 250 mg Rohprodukt erhalten. Nach häufigem Umkristallisieren aus Aceton und Methanol wurden kleine, gelbe Nadeln erhalten. Der Schmelzpunkt betrug 258° C (Lit 263 - 270°).

Die Verbrennung ergab:

C:	69,54%	Ber. 70,0%
	69,26%	
H:	3,55%	Ber. 3,36%
	3,41%	

Trennung eines Glykosidextraktes auf einer Sephadexsäule

Auf eine Sephadex G-25 Säule, deren Säulenmaterial unter Umrühren mehrere Stunden lang mit 0,05 m Natronlauge gequollen war, wurde ein in 7 ml 0,05 mol Natronlauge gelöster Glykosidextrakt (3,5 g) aufgetragen (Säule 2 m lang, 50 mm dick). Die auslaufenden Fraktionen wurden mit dem Fraktionssammler aufgefangen, um nicht nachts die Elution abbrechen zu müssen.

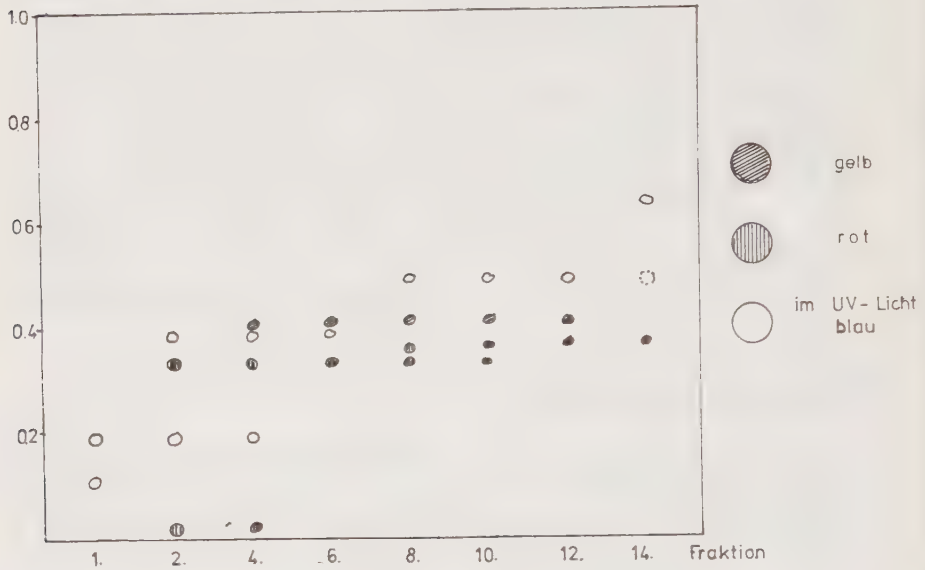


Abb. 33: Glykosidtrennung auf Sephadex-Säule

Kieselgel G Platte
Fließmittel: Äthylacetat 86
Methanol 14
Wasser 4
Besprüht mit methanolischer Kalilauge

Es traten auf der DC-Platte Flecken auf, welche beim Chromatographieren des Glykosidextraktes nicht aufgetreten waren. Vermutlich zersetzten sich die Glykoside. Auch ein weiterer Versuch unter denselben Bedingungen, wobei die Reagensgläser des Fraktionssammlers mit einer neutralisierenden Menge Säure beschickt wurden, brachte kein Verschwinden dieser Nebenflecke.

Trennung der Glykoside auf Magnesiumsilikatsäulen

Magnesiumsilikat wurde durch Zusatz von 15% Wasser auf Aktivitätstufe III desaktiviert. Vorversuche hatten ergeben, daß eine höhere Aktivitätsstufe für eine Trennung ungeeignet war. In eine 20 mm dicke, 1,5 m lange Säule wurde mit Methanol (60%) das Adsorbens eingeschlämmt. Nach vorheriger Extraktion der Aglukone mit Äther wurden 23,8 g Droge mit Methanol erschöpfend im Soxhlet extrahiert. Trockenextrakt: 1,2 g.
Dieser Trockenextrakt wurde zur Hälfte auf obige Säule aufgetragen. Zuerst wurde mit 60%igem Methanol entwickelt, später mit 40%igem Methanol.
Die Fraktionen der Säule waren sehr unrein.
Es wurde daher das Fließmittel geändert. Eingeschlämmt wurde mit Aceton. Die Fließmittel in der Reihenfolge waren Aceton + MeOH 8 + 2; Äthanol; Äthanol-Methanol 3 + 1; Äthanol-Methanol 3 + 5; Methanol; Methanol-Wasser 1 + 1. Die Fraktionen waren trotzdem nicht rein.
Es wurde daraufhin das Adsorbens nicht mehr desaktiviert - Fließmittel wie bei dem letzten Versuch. Die Fraktionen waren nicht sauber.
Eine 4 cm dicke, 1 m lange Säule wurde mit aktivem Magnesiumsilikat gefüllt. Nach längerem Waschen der Säule mit Äthanol wurden 0,4 g Trockenextrakt (s.o.) in Äthanol aufgetragen. Die ersten Fraktionen der Säule liefen sehr schnell durch; sie waren sehr unrein. Ab Fraktion 8 kam eine dc-einheitliche Substanz aus der Säule.

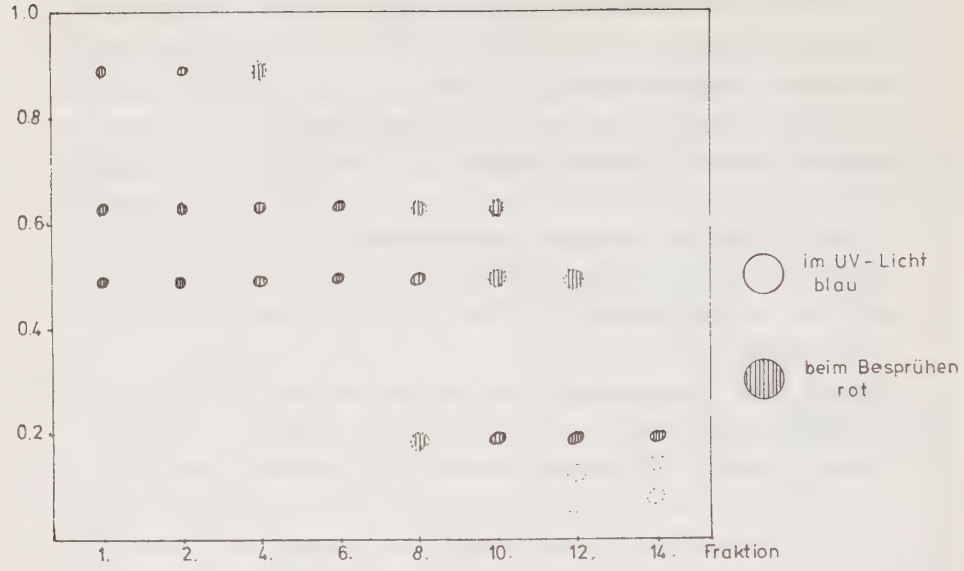


Abb. 34: Dünnschichtchromatogramm einer Trennung auf Magnesiumsilikatsäule

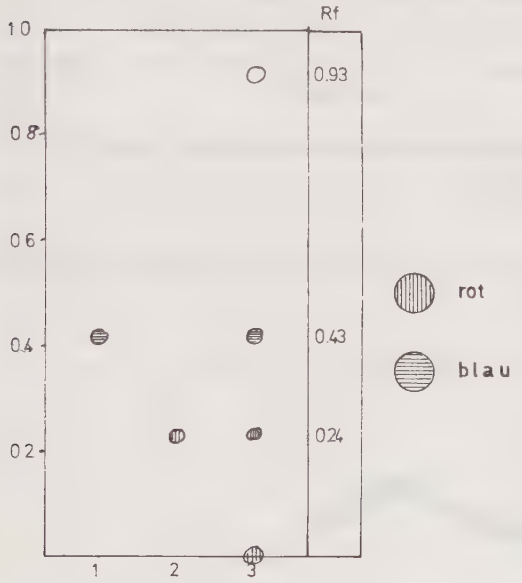
Polyamidplatte
Fließmittel: Methanol 8
Wasser 2
Besprüht mit methanolischer Kalilauge

Die Fraktionen 8 - 13 wurden vereinigt (trocken 35 mg). Die Lösung in Äthanol wurde tropfenweise mit Äther versetzt und eine lila Substanz ausgefällt (8 mg). Der Schmelzpunkt betrug über 320° C.

Die übrigen Fraktionen (180 mg) wurden einer erneuten Trennung auf einer Magnesiumsilikatsäule unterworfen. (Fließmittel n-Propanol). Die Substanz mit Rf-Wert 0,49 konnte nicht mehr aus der Säule eluiert werden; die Substanzen mit Rf-Wert 0,6 und 0,9 konnten auch bei diesem Fließmittel nur als Gemisch eluiert werden.

Trennung von Glykosiden auf Polyamid

Eine 2 cm dicke, 50 cm lange Säule wurde mit Polyamidpulver unter Einschlämmen gefüllt. Sie wurde mehrere Tage mit Äthanol ausgewaschen. Danach trugen wir einen Glykosidextrakt aus 2 g Droge auf (nach vorherigem Abtrennen der Aglukonfraktion). Wir eluierten mit Äthanol und Gemischen mit Methanol bzw. reinem Methanol. Es ließen sich zwei Glykoside in für DC ausreichenden Mengen abtrennen.



1 - Glykosid A
2 - Glykosid B
3 - Glykosidextrakt

Polyamidplatte
Fließmittel: Äthylacetat 100
Methanol 17
Wasser 13

Besprüht mit methanolischer Kalilauge

Abb. 35: Glykosidtrennung auf Polyamidsäule

An der Blaufärbung beim Besprühen mit methanolischer Kalilauge konnte das Glykosid mit Rf-Wert 0,43 als Alizaringlykosid erkannt werden.

NMR-Spektren

Die drei Spektren zeigten alle bei τ = 2,0 die vier Protonen des unsubstituierten Ringes.

Alizarin zeigte im Sepktrum bei τ = 2,5 bzw. 2,8 die beiden Dupletts der cis-ständigen, benachbarten Protonen (J τ = 7 Hz; Orthokopplung). Bei τ = 0,92 sind die beiden OH-Gruppen sichtbar. Bei Purpurin ist nur eine OH-Gruppe im Spektrum zu finden. Das Proton an C_3 ist bei τ = 3,5 sichtbar.

Bei Purpuroxanthin ist ebenfalls nur eine OH-Gruppe zu finden. Vielleicht ist eine Wasserstoffbrückenbindung von C_1 zur Carbonylgruppe. Bei τ = 3,0 und 3,5 sind die beiden Protonen von C_2 und C_4 sichtbar (J τ = 2,5 Hz; Metakopplung).

Die Spektren wurden in einer Konzentration von 100 mg/0,5 ml in deuteriertem Dimethylsulfoxid gemessen.

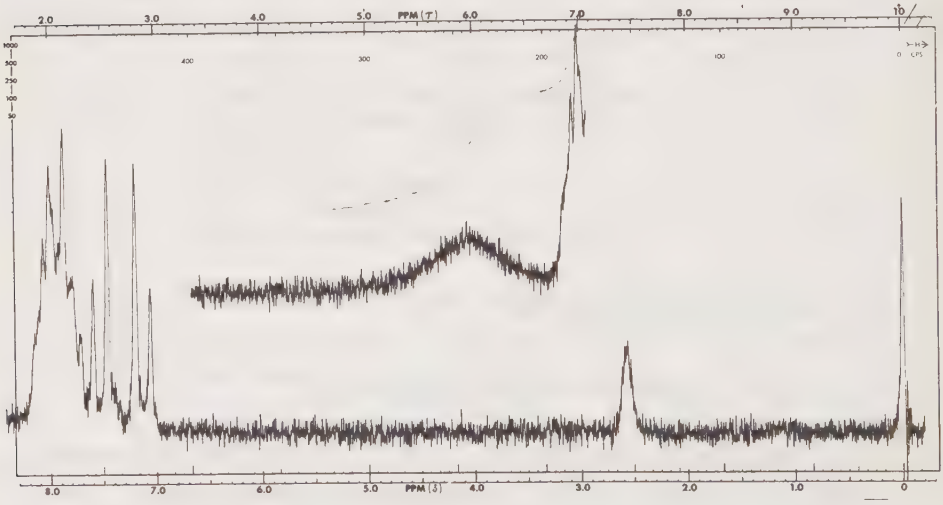


Abb. 46: Alizarin

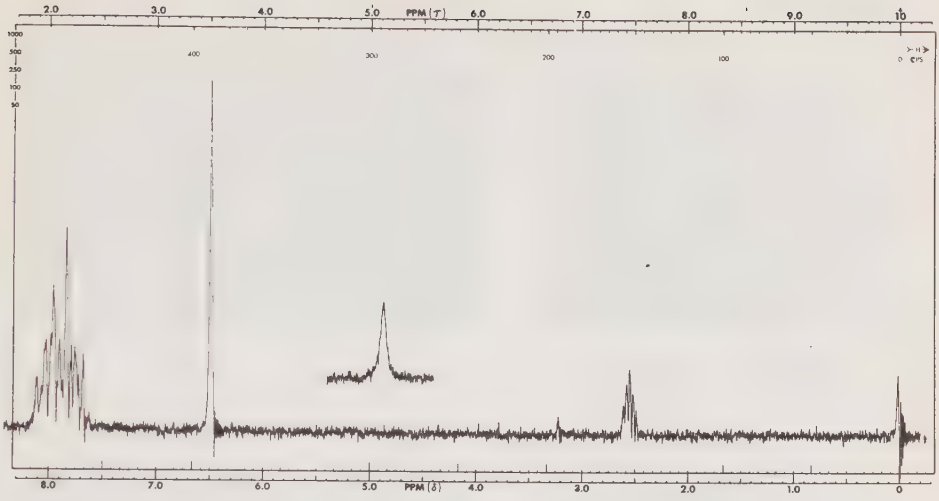


Abb. 47: Purpurin

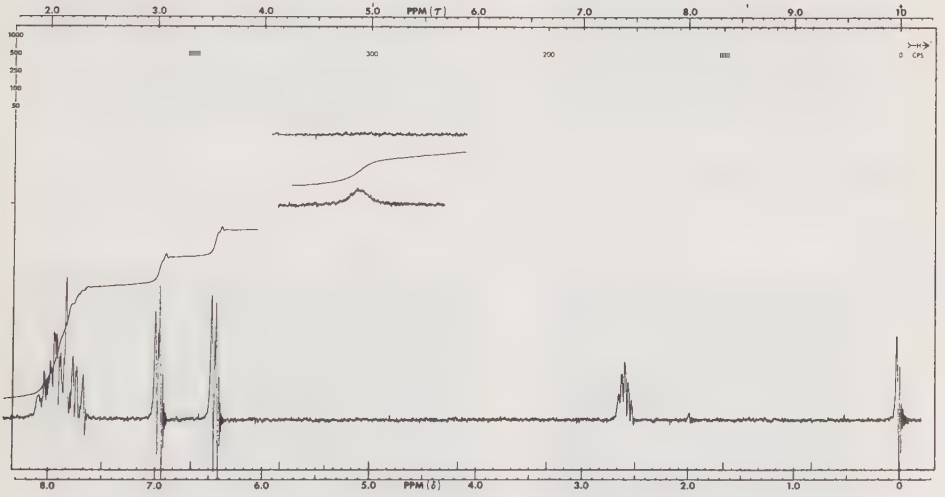


Abb. 48: Purpuroxanthin

IR-Spektren

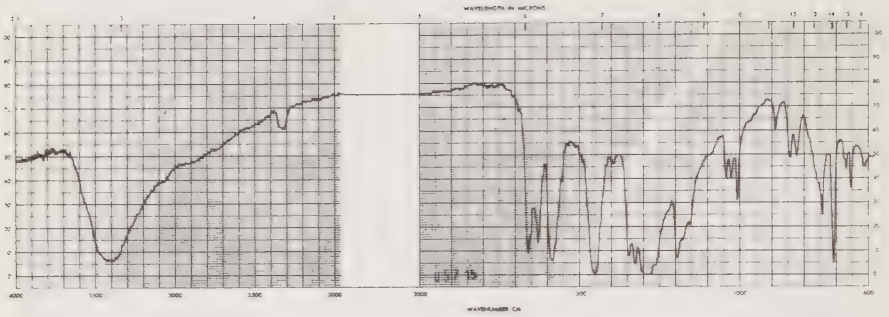


Abb. 49: Alizarin in KBr

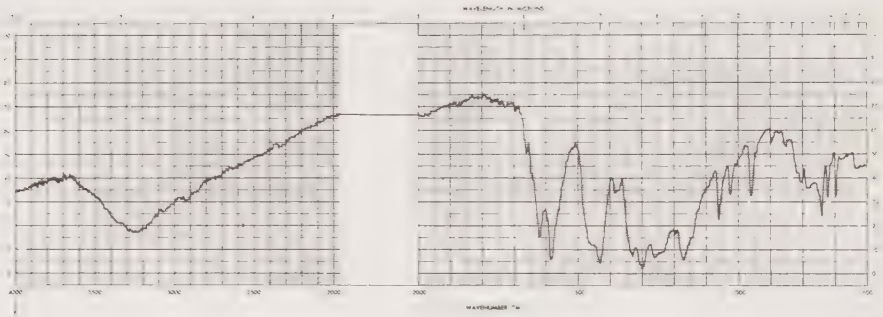


Abb. 50: Purpurin in KBr

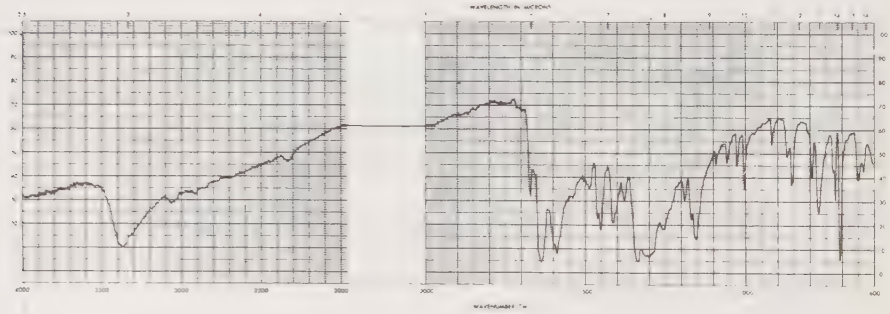


Abb. 51: Purpuroxanthin in KBr

LITERATURVERZEICHNIS

+) Plinius d.Ä., Naturalis historia
Dioscurides, Arzneimittellehre

1) J. Keller, Pharmaz. 6, 675 (1951)
2) R. Hegnauer, Planta med. 7, 354 (1959)
3) H. Orth, Planta med. 9, 277 (1961)
4) C. Graebe u. C. Liebermann, Ber. dtsch. chem. Ges. 1, 49 (1868)
5) J. Keller und Görlich, Z. f. Urol. H1 (1944)
6) P.J. Robiquet u. J.J. Colin, A.ch. (2) 34, 225 (1827)
7) J. Wolff und A. Strecker, Liebigs Ann. Chem. 75, 1 (1850)
8) F. Rochleder, Liebigs Ann. Chem. 80, 321 (1851)
9) F. Rochleder, Liebigs Ann. Chem. 82, 205 (1852)
10) E. Schunck, Liebigs Ann. Chem. 66, 174 (1847)
11) H. Debus, Liebigs Ann. Chem. 66, 357 (1847)
12) C. Graebe u. C. Liebermann, Ber. dtsch. chem. Ges. 2, 14 (1869)
13) C. Graebe u. C. Liebermann, Ber. dtsch. chem. Ges. 2, 332 (1869)
14) F. de Lalande, Ber. dtsch. chem. Ges. 7, 1545 (1874)
15) A.v.Baeyer u. H. Caro, Ber. dtsch. chem. Ges. 8, 152 (1875)
16) R. Schützenberger u. Schiffert, Bull (2) 4, 12 (1865)
17) A. Rosenstiehl, Ber. dtsch. chem. Ges. 7, 1547 (1874)
18) C. Liebermann, Liebigs Ann. Chem. 183, 145 (1876)
resp. 213
19) E. Noah, Ber. dtsch. chem. Ges. 19, 332 (1886)
20) E. Schunck, Liebigs Ann. Chem. 81, 336, 348 (1852)
21) J. Stenhouse, Liebigs Ann. Chem. 130, 325 (1864)
22) E. Schunck u. H. Roemer, Ber. dtsch. chem. Ges. 10, 172 (1877)
23) E. Schunck u. H. Roemer, Ber. dtsch. chem. Ges. 10, 790 (1877)
24) P.C. Mitter u. H. Biswas, Ber. dtsch. chem. Ges. 65, 622 (1932)
25) A. Rosenstiehl, Ber. dtsch. chem. Ges. 9, 1808 (1876)
26) A. Rosenstiehl, Ber. dtsch. chem. Ges. 10, 734 (1877)

27) E. Schunck, Liebigs Ann. Chem. 87, 344 (1853)

28) E. Schunck u. L. Marchlewski, J. chem. Soc. (London) 63, 973 (1893)

29) E. Schunck u. L. Marchlewski, J. chem. Soc. (London) 65, 183 (1894)

30) P.C. Mitter u. P. Gupta C. 1928I, 2398

31) C. Graebe u. C. Liebermann, Liebigs Ann. Chem. Suppl. 7, 257, 296 (1869)

32) C. Liebermann u. O. Bergami, Ber. dtsch. chem. Ges. 20, 2241 (1887)

33) E.T. Jones u. A. Robertson, J. chem. Soc. (London) 1933, 1167

34) R. Hill u. D. Richter, Nature (London) 138, 38 (1936)
ref. C. 1936II, 4013

35) D. Richter, J.chem. Soc. (London) 1936, 1701

36) G. Zemplen u. R. Bognár, Ber. dtsch. chem. Ges. 72, 913 (1939)

37) E.T. Jones u. A. Robertson, J. chem. Soc. (London) 1930, 1699

38) R. Hill, Nature (London) 134, 628 (1934)
ref. C. 1935II, 1021

39) R. Hill u. D. Richter, J. chem. Soc. (London) 1936, 1714

40) R. Schwarz, Liebigs Ann. Chem. 83, 57 (1852)

41) H. Herissey, Comp. rend. 180, 1695 (1925)
ref. C. 1925II, 659

42) H. Herissey, J. pharm. chim. (8) 4, 481 (1926)

43) H. Lindsay, H. Briggs, G.A. Nicholls, J. chem. Soc. (London) 1954, 3940

44) H. Briggs u. B.F. Cain, J. chem. Soc. (London) 1954, 4182

45) J. Grimshaw, Chem. and Ind. 1961, 403
ref. C. 1964-39, 951

46) H. Auterhoff u. K. Boehme, Arch. Pharmaz. 301, 793 (1968)

47) K. Boehme, Inauguraldissertation Tübingen 1968

48) H. Gänshirt u. K. Morianz, Arch. Pharmaz. 293/65, 1065 (1960)

49) H. Gänshirt, F.W. Koss, K. Morianz, Arzneimittel-Forsch. 10, 943 (1960)

50) F. Schlemmer u. E. Link, Pharmaz. Ztg. 104, 1349 (1959)

51) H.L. Bird, Analytic. Chem. 35, 346 (1964)

52) P. Haefelfinger, Arch. Pharmaz. 297, 641 (1964)

53) E. Stahl, Dünnschichtchromatographie, 2. Aufl. Springer-Verlag, Berlin 1967

54) A.R. Burnett u. R.H. Thomson, J. chem. Soc. (London) 1968, 2437

55) L. Boross u. T. Perényi, Planta med. 14, 234 (1966)

56) L. Boross, Acta chim. Hung. 35, 195 (1963)

57) W. Raszeja u. F. Kacmarek, Herba polonica 2, 106 (1966)

58) V.A. Stikhin, A.I. Ban'korski, M.E. Perel'son, Khim. Prirodn. Soedin., Akad. Nauk. UDSSR 2 (1), 12 (1967)
ref. C. 1967-37, 129, 1121 (1967)

59) Stouder u. Adams, J. Amer. chem. Soc. 49, 2043 (1927)

Lebenslauf

Am 10. November 1935 wurde ich, Friedrich Schröppel, als Sohn des Apothekers Dr. Ferdinand Schröppel und seiner Ehefrau Gertrud geb. Singer in Tübingen geboren. Ab 1942 besuchte ich die Volksschule in Markgröningen, Krs. Ludwigsburg, und anschließend in Ludwigsburg das Schillergymnasium. Mein Vater pachtete 1947 für mehrere Jahre die Hofapotheke in Sigmaringen und eröffnete 1950 die Löwenapotheke in Tübingen. Nach dem Besuch der Gymnasien in Sigmaringen und Tübingen legte ich 1954 am Uhlandgymnasium in Tübingen die Reifeprüfung ab. Meine Praktikantenzeit absolvierte ich in der Schloßapotheke Heidenheim/Brenz und bestand 1956 in Stuttgart das Vorexamen. Ich studierte Pharmazie in München und Tübingen und legte im April 1960 in Tübingen die Pharmazeutische Prüfung ab. Nach einigen Monaten Kandidatenzeit in der Elisabethenapotheke in München war ich mehrere Jahre in der Apotheke am Hauptbahnhof in Hamburg tätig. 1961 erhielt ich die Approbation als Apotheker. 1965 arbeitete ich ein Jahr für die Fa. Merck Darmstadt im wissenschaftlichen Außendienst. 1966 begann ich mit der Abfassung der Dissertationsarbeit am Pharmazeutisch-chemischen Institut der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter der Leitung von Herrn Professor Dr. H. Auterhoff. Vom 1. Juli 1966 an war ich an diesem Institut als wissenschaftliche Hilfskraft tätig und seit dem 1. Oktober 1968 als Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle. Ich bin seit 1962 verheiratet und habe eine Tochter.

Meine akademischen Lehrer außer Herrn Prof. Dr. H. Auterhoff waren die Herren Professoren und Dozenten:
E. Bamann, K.G. Bergner, C.H. Brieskorn, W. Cyran, E. Graf, W. Hückel, H. Kaiser, G. Kallinich, R. Schmiedel (Pharmazie); R. Huisgen, E. Müller (Org. Chemie); E. Wiberg (Anorg. Chemie); L. Brauner, E. Bünning, L. Hörhammer, K. Hummel, K. Mägdefrau (Botanik); H. Gerlach, H. Krüger (Physik); F. Lembeck (Pharmakologie); G. Weitzel (Physiol. Chemie); R.E. Bader (Hygiene).